



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Ana Paula Pimentel Cassilhas

Análise genômica e pós-genômica de proteínas de
Leishmania chagasi

Recife
Abril / 2003

ANA PAULA PIMENTEL CASSILHAS

**ANÁLISE GENÔMICA E PÓS-GENÔMICA DE
PROTEÍNAS DE *Leishmania chagasi***

Tese defendida no Curso de
Doutorado em Ciências
Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco para
obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas, Área de
Concentração em
Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Paes de Andrade

(Departamento de Genética - UFPE)

Co-orientadora: Profa. Dra. Cynthia Rayol de Andrade

(Departamento de Histologia e Embriologia - UFPE)

Recife

Abril / 2004

ANÁLISE GENÔMICA E PÓS-GENÔMICA DE PROTEÍNAS DE
Leishmania chagasi

Ana Paula Pimentel Cassilhas

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares

Prof. Dr. Paulo Paes de Andrade

Departamento de Genética – UFPE (Orientador)

Profa. Dra. Luana Cassandra B. B. Coelho

Departamento de Bioquímica - UFPE

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

Profa. Dra. Marise Sobreira Bezerra da Silva

Departamento de Microbiologia - CPqAM / FIOCRUZ – PE

Profa. Dra. Tereza Cristina Leal Albino

Departamento de Microbiologia - CPqAM / FIOCRUZ – PE

Membros Suplentes

Profa. Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida

Departamento de Microbiologia - CPqAM / FIOCRUZ – PE

Profa. Dra. Neide Santos

Departamento de Genética - UFPE

Ao meu pai e minha mãe que regaram a semente
do questionamento em todo o tempo desde a minha
iniciação científica.

À Júnior e ao meu filho Bruno que me deram tanta
força para concluir mais uma etapa da minha vida.

Dedico este trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS		i
LISTA DE TABELAS		ii
LISTA DE FIGURAS		iii
LISTA DE ABREVIATURAS		viii
RESUMO		xi
ABSTRACT		xii
1 – Introdução	01	
2 - Revisão de literatura	03	
2.1 – Leishmanioses	03	0
2.2 - Leishmaniose visceral ou calazar	05	3
2.3 - Agente etiológico	07	
2.4 - Ciclo de vida	09	
2.5 - Terapêutica e controle	11	
2.6 - Resposta imune no Calazar	12	
2.7 - Imunidade pós-tratamento	13	
2.8 - Vacinas em andamento	14	
2.8.1 - Vacinas de 1ª geração	14	
2.8.2 - Vacinas de 2ª geração	15	
2.9 - Proteínas de choque térmico (HSP)	19	
2.10 - HSP70 e a resposta imune	21	
2.11 - Resposta anti-HSP70 no calazar	24	
2.12 - HSP 83 do gênero <i>Leishmania</i> e a resposta imune	26	
2.13 - HSP83 e a resposta imune no calazar	27	
2.14 - Genomas de parasitas	28	
2.15 - Genética de <i>Leishmania</i>	33	
2.16 - Bioinformática	36	
2.16.1 - Anotação de genes	36	
2.16.2 - Alinhamento múltiplo de seqüências	38	

3 – Referências	42
4 – Capítulos	60
Capítulo I: Identificação <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> de domínios antigênicos em HSP70 de <i>Leishmania chagasi</i>	66
Capítulo II: Epitopos, sítios de trans-encadeamento e poli-adenilação na HSP83 de <i>Leishmania chagasi</i> : uma análise <i>in silico</i> .	92
Capítulo III: O transcriptoma da <i>Leishmania chagasi</i> : lições das primeiras 10.000 sequências	114
5 – Conclusões	135
Capítulo I	135
Capítulo II	136
Capítulo III	137
Anexos	138

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas oportunidades de continuar fazendo o que gosto.

Ao Prof. Dr. Paulo Paes de Andrade, pela orientação e confiança durante a realização deste trabalho;

À Profa. Dra. Cynthia Rayol de Andrade, pela dedicação como profissional e amiga;

À Profa Eliete Cavalcanti da Silva e à Profa. Giovanna Negromonte Torquato, pela amizade e convivência intensas durante este período;

Ao Dr. Marcel Ramirez, pela ajuda científica em uma fase do trabalho;

À Biomédica Daniela Bezerra Lóssio, que como aluna de iniciação científica do Laboratório de Genética Molecular fez do período de convivência o que se espera no início de uma vida científica, com dedicação e colaboração durante a realização deste trabalho;

À Rafael Queiroz pela atenção, amizade e ajuda em várias fases de execução do trabalho;

Ao Dr. Frederico Abath, Dr. Roberto Werkauser, Prof. Mineo Nakazawa e Profa. Edeneide Xavier do Depto. de Imunologia, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, pela facilidade no uso das instalações desta Instituição;

À D. Zizi e à Celuza, pelo apoio “logístico” para a realização dos experimentos;

Aos colegas de turma do Curso de Doutorado (2000), pelo convívio e aproveitamento científico durante a primeira fase do percurso;

À Profa. Mileide Montenegro, pela ajuda sempre eficiente nos ensaios imunológicos;

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular do Depto. de Genética/UFPE, Guerrinha, Mirelle, Márcio, Valdir, Márcia, Marcelo, Ivone, Geórgia, Mércia, Ivone, Igor, Marcílio, Marília, Marcelo, que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

À CAPES, FACEPE e CNPq, pelo apoio financeiro.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1	Painel eco-epidemiológico da leishmaniose visceral, mostrando o gênero <i>Lutzomyia</i> , flebótomos vetores, as espécies de <i>Leishmania</i> , com seus respectivos sub - gêneros (<i>Leishmania</i> ou <i>Viannia</i>), e a respectiva distribuição geográfica nas Américas.....	07
Tabela 2	Lista de antígenos recombinantes testados no TDR.....	32

CAPÍTULO III

Tabela 1	<i>Uso de códon Leishmania chagasi</i> – (31 genes: 6.551 códons). Os códons mais utilizados estão representados de vermelho e aqueles menos utilizados, de azul.....	129
Tabela 2	Seqüências filogeneticamente restritas à família Trypanosomatidae..	130/131

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1 Distribuição das leishmanioses visceral (esquerda) e cutânea ou tegumentar (direita) no Mundo (TDR, 2002). As duas endemias ocorrem em áreas tropicais e sub - tropicais, inclusive em torno do Mediterrâneo. A leishmaniose visceral pode ser encontrada em países de clima relativamente frio, como Portugal, França, Espanha e Grécia e em países dos Bálcãs. A leishmaniose tegumentar também pode ocorrer em países de clima temperado. 06
- Figura 2 Gráficos representativos da incidência de casos de calazar por região brasileira. Fonte: http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/leish_viscl/..... 08
- Figura 3A Promastigotas, formas flageladas de *Leishmania*, com o núcleo ovalado e mais corado (seta) e o cinetoplasto, localizado abaixo da estrutura nuclear (seta menor)..... 10
- Figura 3B Presença de amastigotas intracelulares (setas) de *L. infantum* infectando o citoplasma do macrófago de hamster. O núcleo da célula hospedeira pode ser visto corado em rosa. Fonte: [http:// www - medlib.med.utah.edu/parasitology/ldonoim.html](http://www.medlib.med.utah.edu/parasitology/ldonoim.html)..... 10
- Figura 4 Fêmea hematófaga do *Lutzomyia longipalpis* realizando o repasto sanguíneo. Fonte: <http://www.niaid.nih.gov/newsroom/focusonbugborne01/leish-htm>..... 11
- Figura 5 Ciclo de vida da *L. chagasi* mostrando a picada do inseto e inoculação no hospedeiro de formas promastigotas, a interiorização em macrófagos e posterior diferenciação em amastigotas. As amastigotas intracelulares se multiplicam até romperem a célula hospedeira, transformando-se em promastigotas novamente, circulantes no sangue, para então serem capazes de infectar novas células ou infectarem o inseto, no momento do repasto sanguíneo. No interior do intestino médio do inseto, as formas promastigotas se multiplicam e migram para o aparelho bucal, a fim de infectarem o hospedeiro vertebrado novamente, durante o repasto sanguíneo, fechando assim o ciclo evolutivo..... 12

Figura 6	Representação esquemática do processo de transcrição em <i>Leishmania</i> . No lado esquerdo da figura está representada a transcrição das três classes de genes que codificam o precursor do mini-exon. Da seqüência original de 363nt do genoma, apenas 107 são transcritos, sendo apenas 39nt transencadeados para a região 5' do mRNA policistônico. Os processos de transencadeamento e poliadenilação completam a transcrição, produzindo mRNA maduros monocistônicos. Fonte: Adaptação da figura de Montenegro (2003), baseada nas revisões de Stiles <i>et al.</i> ,1999 e Clayton,2002.....	15
Figura 7	Atuação das HSP70 sobre o enovelamento das proteínas recém sintetizadas no ribossomo. As chaperoninas ligam-se ao polipeptídeo formando uma série de complexos de ligações, com gasto de duas moléculas de ATP, auxiliando no enovelamento funcional da proteína. Figura adaptada do site: http://www.med.hokudai.ac.jp/~bio-1w/kogi/files/6-83.jpg ..	22
Figura 8	Ação das chaperoninas durante o transporte protéico. O polipeptídeo parcialmente desdobrado é transporte do citosol para a mitocôndria. Chaperoninas citosólicas estabilizam a configuração desdobrada e as proteínas mitocondriais facilitam o transporte e, subseqüentemente, o dobramento da cadeia polipeptídica dentro da organela. Fonte: Suzue e Young (1996).....	23
Figura 9	Fluxograma para o desenvolvimento de estratégias de abordagens genômicas e pós-genômicas visando alcançar o diagnóstico, profilaxia e terapêutica da leishmaniose visceral	35
Figura 10	Esquema representativo de todas as etapas exigidas desde o término do sequenciamento até o alinhamento local de seqüências (BLAST)....	37

CAPÍTULO I

Figura 1	Diagrama representando a composição do <i>cluster 70cit</i> , que inclui a ORF completa da HSP70 de <i>L. chagasi</i> . Todos os clones estão representados na posição em que suas extremidades 5' não traduzidas se inserem no <i>cluster</i> . As regiões 5' não traduzida e 3' não traduzida estão destacadas nas extremidades do <i>cluster</i> . A posição do hexapeptídeo EADDRA (seta) está indicada para todos os clones. Fonte: Queiroz, 2003.....	85
----------	---	----

- Figura 2 Reatividade no *Western blot* do pool de soros de pacientes com leishmaniose visceral frente aos produtos gênicos de 6 dos 17 clones que compõem o *cluster 70cit*. Os pesos moleculares (kDa) estão indicados à esquerda da figura. Os clones 1 e 8 apresentaram 2 bandas reativas, mas o peso molecular considerado para cada proteína foi o da banda de maior peso..... 86
- Figura 3 Reatividade do *pool* de soros de pacientes com leishmaniose visceral após imunoadsorção cruzada, de acordo com a semelhança antigênica dos 6 produtos gênicos. A diagonal (negrito) contém as reações homólogas (soro imunoadsorvido contra um produto gênico e testado sobre este mesmo produto). (+) indica reação e (Ø) indica ausência de reação. Lc = *L. chagasi*. NT = *E.coli* DH10B não transformada..... 87
- Figura 4 Alinhamento das regiões mediana e carboxi-terminal das seqüências deduzidas de aminoácidos (entre os aa 241 e 654) da HSP70 de *L. chagasi* com aquelas de outros tripanosomatídeos. As áreas sombreadas (A, B, C e D) indicam regiões já descritas (para *L. infantum*) como antigênicas e imunogênicas, além de altamente divergentes, tanto entre espécies próximas, como entre *Leishmania* e *Trypanosoma*. A = aa 255 a 261; B = aa 529 a 534 (hexapeptídeo EADDRA); C = aa 572 a 591; D = aa 602 a 654. O início das seqüências dos produtos dos clones 1 e 7 está indicado com setas..... 88
- Figura 5 Histograma comparativo das regiões homólogas e divergentes ao longo da seqüência completa de aminoácidos da HSP70. As barras verticais representam o número absoluto de alterações observadas, para cada aminoácido, na comparação com as seqüências de HSP70 de 12 tripanosomatídeos (acima do eixo horizontal) e as de 12 organismos não aparentados aos tripanosomatídeos (abaixo do eixo horizontal), tomando-se como referência a seqüência de aminoácidos deduzida para *L. chagasi*. Tanto os tripanosomatídeos como os demais organismos foram selecionados entre os 30 primeiros, cujas HSP70, ou suas ortólogas, apresentaram maior similaridade com a HSP70 de *L. chagasi*. Os números nas extremidades indicam o primeiro e o último aminoácido da HSP70 de *L. chagasi*. A, B, C e D indicam as regiões descritas na figura 4, que mapeiam sobre segmentos com alta concentração de divergência..... 89

CAPÍTULO II

- Figura 1 Histograma comparativo das regiões de divergência e conservação ao longo da seqüência completa de aminoácidos de HSP83. As barras verticais representam o número absoluto de alterações observadas, para um dado aminoácido, entre as seqüências de HSP83 de 14 tripanosomatídeos (parte superior) e de 14 organismos não aparentados aos tripanosomatídeos (parte inferior), tomando-se como referência a seqüência de aminoácidos deduzida para *L. chagasi*. Tanto os tripanosomatídeos quanto os demais organismos foram selecionados entre os 35 primeiros cujas HSP83 ou suas ortólogas apresentaram maior similaridade com a HSP83 de *L. chagasi*. Os números nas extremidades do eixo representam o primeiro e último aminoácido da seqüência. As regiões A, B e C indicam trechos da proteína já descritos como antigênicos ou imunogênicos e as barras sobre a região B mostram epitopos definidos nesta região..... 104
- Figura 2 Alinhamento dos primeiros 60 nucleotídeos da região intergênica de HSP83 de *Leishmania* imediatamente abaixo (3') do sítio de trans-encadeamento. Os primeiros 10 nucleotídeos estão ressaltados. Há uma elevada conservação da região, para a vizinhança do gene da HSP83, e a presença de adeninas em trinucleotídeos CCA, CGA e GCA na região de poli-pirimidinas..... 105
- Figura 3 Alinhamento dos 20 nucleotídeos vizinhos ao sítio de trans-splicing dos genes da HSP83, da a-tubulina, da proteína ribossomal L24, da histona H3 e do gene similar ao do produto gênico Tcc2i18.5 de *T. cruzi*. Observa-se uma considerável conservação da região intergênica entre seqüências do mesmo gene, mas não parece haver um padrão conservado entre os vários genes para os 10 nucleotídeos 5' do sítio acceptor de encadeamento..... 106
- Figura 4 Alinhamento dos primeiros 60 nucleotídeos da região intergênica de HSP83 imediatamente abaixo (3') do sítio de poli-adenilação. Os primeiros 10 nucleotídeos estão ressaltados. Há uma elevada conservação da região, para a vizinhança do gene da HSP83..... 107
- Figura 5 Alinhamento dos 20 nucleotídeos vizinhos ao sítio de poli-adenilação dos genes da HSP83, da a-tubulina e da histona H3. Observa-se uma discreta conservação da região intergênica entre seqüências do mesmo gene, mas não parece haver um padrão conservado entre os vários genes para os 10 nucleotídeos 3' do sítio de poli-adenilação..... 108

CAPÍTULO III

- Figura 1 Categorização funcional dos 161 *clusters* de *L. chagasi*. No eixo da abcissa está representado o percentual de identidade que variam de 20 a 100. As barras horizontais indicam os percentuais de identidade para cada categoria, obtidos a partir do BLASTx das seqüências produzidas pelo ProGeNE com as seqüências do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os pontos marcam as médias de identidade para cada categoria funcional. Os valores entre parênteses ao lado das classes significam o número de *clusters* que foram agrupados nas referidos grupos..... 132
- Figura 2 Conteúdo GC médio dos 31 *clusters* de *Leishmania chagasi* que apresentaram ORF completas. Os pontos do gráfico representam as médias de GC nas distintas regiões do gene e as barras verticais que cortam os pontos representam o desvio padrão (para mais e para menos). O gráfico demonstra o elevado conteúdo GC nas regiões codificantes, que é esperado para um organismo rico em GC e que tem um uso de códon distorcido, como é o caso da *L. chagasi*. 133
- Figura 3 Distribuição, por táxon, dos 161 clusters de uma biblioteca de EST de *L. chagasi* que apresentaram similaridade com genes conhecidos depositados no GenBank. Os números entre parênteses indicam o número de clusters em cada classe..... 134

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	<i>Antigen presenting cell</i> – célula apresentadora de antígeno
ATP	Adenosina trifosfato
A2	<i>A2 genes</i> – família multigênica de amastigotas
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i> – cromossomas artificiais bacterianos
BLAST	<i>Basic local alignment sequences tools</i> – Programa básico de alinhamento local de seqüências
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> – Albumina do soro bovino
CD4	Linfócito T do tipo CD4+
cDNA	Ácido desoxiribonucléico complementar
CFA	Adjuvante completo de Freund
<i>Cluster</i>	Agrupamento de seqüências gênicas de uma dada proteína
<i>Cluster 70cit</i>	Agrupamento de seqüências gênicas da proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70)
CP	Cisteína Proteinase
EADDRA	Ácidoglutâmico/alanina/ácidoaspártico/ácido aspártico/arginina/alanina
<i>E. coli</i> linhagem DH10B	<i>Escherichia coli</i> da linhagem DH10B
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> - Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima
EST	<i>Expressed sequence tags</i> – Etiquetas de genes expressos
EULEISH	<i>Leishmania major</i> da linhagem “Friedlin” .
E.VALUE	Equação associada ao valor do <i>score</i>
FML	<i>Fucose mannose ligand</i> – Ligante de fucose e manose
FPA	<i>Flagellar pocket antigen</i> – antígeno da Bolsa flagelar
FUNASA	Fundação Nacional da Saúde
GBP	<i>Gene B protein</i> - Proteína do gene B
GENBANK	Banco público do NCBI
GP	Glicoproteína
GP63	Glicoproteína de 63 kDa
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
GSS	<i>Genome survey sequence</i> –Seqüência de inspeção do genoma
G6	Glicoproteína 6
HASP	<i>Hydrophilic acylated surface protein</i> – proteína de superfície acetilada hidrofílica
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> - Síndrome da imunodeficiência adquirida
HSP	<i>Heat shock protein</i> – Proteína de choque térmico
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
HSP83	Proteína de choque térmico de 83 kDa
HSP90	Proteína de choque térmico de 90 kDa
HSC	Proteína de choque térmico cognata
H6	Histona 6

IFN- γ	Interferon- gama
IL	Interleucina
INTERPRO	Banco secundário para buscas de domínios protéicos
IPTG	Isopropil-tiogalactosídeo
kDa	Quilodalton
kDNA	<i>Kinetoplast DNA</i> – DNA do cinetoplasto
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> – Enciclopédia de Kioto de genes e genomas
KMP-11	<i>Kinetoplastid membrane protein</i> – proteína de membrana da Ordem Kinetoplastida de 11 kDa
LACK	Homólogo de <i>Leishmania</i> dos receptores para quinase C ativada
LB	Meio de cultura Luria Bertani
LbbF2	Fração 2 de <i>Leishmania braziliensis</i>
LGN	<i>Leishmania Genome Network</i> – Rede Genômica de <i>Leishmania</i>
LIT	<i>Liver Infusion Broth</i> – Infusão de fígado
MBP	<i>Mannose binding protein</i> – proteína ligadora de manose
MP	HSP mitocondrial
MPL	<i>Corixa's monophosphoryl lipid A</i> – Tipo de adjuvante
Mtp	HSP do cinetoplasto
NCBI	<i>Nacional Center of Biotechnology Information</i>
NNN	Meio de cultura parasitário
ORF	<i>Open read frame</i> – Quadro aberto de leitura
PBS	Salina tamponada com fosfato
PBS-T	Salina tamponada com fosfato e Tween
PFGE	<i>Pulse field gel electrophoresis</i> – Eletroforese em gel de campo pulsado
PHRED	Programa que analisa a qualidade das bases de uma seqüência
Poli-A	Poli-adenina
PROGENE	Programa Genoma Nordeste
PROSITE	<i>Site</i> de busca de famílias e domínios protéicos
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
SBRI	<i>Seattle Biomedical Research Institute</i> – Instituto de pesquisa biomédica de Seattle
SCORE	Pontuação dada à um alinhamento correto
SDS	Sulfato de sódio dodecila
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida
SL	Guia de encadeamento
SLA	<i>Soluble leishmanial antigen</i> – antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>
SHERP	<i>Small hydrophilic ER localising protein</i> – proteína pequena hidrofílica localizada no retículo endoplasmático
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
SUCEST	<i>Sugar-Cane EST sequencing project</i> – Projeto de sequenciamento de <i>EST</i> de Cana-de-açúcar
SWISS-PROT	Banco secundário para análise de proteínas
TH1	Resposta imunológica mediada por linfócitos T auxiliar do tipo 1

TH2	Resposta imunológica mediada por linfócitos T auxiliar do tipo 2
TDR	<i>Research and Training in Tropical Disease</i> – Pesquisa e treinamento em doenças tropicais
TMB	Tetrametilbenzidina
TSA	<i>Thiol specific oxidant</i> – oxidante tiol específico
UTR	<i>Untranslated region</i> – região não traduzida
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial da Saúde

RESUMO

As leishmanias são parasitas intracelulares que causam um amplo espectro de doenças, desde lesões cutâneas isoladas até formas viscerais fatais. Apesar dos progressos na epidemiologia, imunologia e bioquímica destas parasitoses. As primeiras 10.000 seqüências de cDNA de *Leishmania chagasi*, produzidas pelo Programa Genoma Nordeste (ProGeNE), foram analisadas quanto à categorização funcional e conteúdo GC de seqüências codificantes e não-codificantes, além de ter sido identificado um grupo de genes restritos aos tripanosomatídeos. Foram também analisados dois genes conservados, *hsp70* (proteína de choque térmico de 70kDa) e *hsp83*, que apresentavam seqüência completa. Polipeptídeos recombinantes contendo seqüências de HSP70 progressivamente maiores foram usados em ensaios de imunoabsorção para identificar regiões antigênicas em toda a extensão da proteína. As seqüências de aminoácidos deduzidas para HSP70 e HSP83 foram comparadas com um grande grupo de seqüências similares entre os tripanosomatídeos e entre outros grupos taxonômicos. Os epitopos ou regiões antigênicas, definidos neste estudo mapearam claramente sobre as regiões divergentes. Os sítios precisos de trans-encadeamento e poli-adenilação para HSP83 foram identificados através de estudos comparativos das regiões 5'- e 3'-não traduzida e das seqüências genômicas correspondentes de HSP83 e de outros genes disponíveis para *L. chagasi*. Este trabalho espera contribuir, portanto, para um melhor entendimento da antigenicidade das HSP nas infecções e para uma definição dos sítios de processamento do RNAm em *Leishmania*.

Palavras-chave: *Leishmania chagasi*; leishmaniose visceral; HSP70; HSP83; epitopo de linfócito B; sorodiagnóstico; trans-encadeamento; poli-adenilação.

e. mail: paulacassilhas@aol.com

ABSTRACT

Leishmania are intracellular parasites that cause a large spectrum of diseases, ranging from single cutaneous lesions to fatal visceral infections. In spite of the progress towards the understanding of the epidemiology, immunology and biochemistry of the leishmaniases, an increase in new cases is observed worldwide. Recently a large set of *Leishmania chagasi* cDNA sequences were made available by the Northeast Brazilian Genome Project. In this work we briefly analyze the distribution of the first 10,000 sequences in functional categories, the GC content of coding and non-coding sequences and identified a set of genes restricted to trypanosomatids. We also analyzed two conserved genes, *hsp70* and *hsp83*, whose full length cDNA sequences were available. Recombinant polypeptides containing progressively larger HSP70 sequences were used in an immunoadsorption experiment to identify antigenic regions over the full range of the protein. Moreover, the deduced aminoacid sequences for HSP70 and HSP83 were compared with a large set of similar sequences among trypanosomatids, as well as other taxa, and divergent regions were clearly associated with epitopes or antigenic regions, defined in this work or elsewhere. Based of a comparative study of 5'-UTR and 3'-UTR, and of the corresponding genomic sequences of *hsp83* and of other genes available for *L. chagasi*, as well as for other *Leishmania* species, we identified the precise trans-splicing and poly-adenilation sites for *hsp83*. This work offers, therefore, an important contribution towards the understanding of the antigenicity of HSP in parasitic and microbial infections and to the definition of mRNA processing sites in *Leishmania*.

1. Introdução

Os protozoários do gênero *Leishmania* são os agentes causadores de um amplo espectro de doenças humanas. Estudos apontam treze espécies distintas como responsáveis por manifestações clínicas diferentes, compreendendo desde lesões de pele e mucosas até a forma visceral (leishmaniose visceral americana ou calazar), que é, em geral, fatal se não for tratada (Marty e Rosenthal, 2002).

Estas doenças resultam da multiplicação dos parasitas no sistema fagocítico mononuclear dos pacientes, após o repasto sanguíneo dos vetores, insetos da família Phlebotominae. O controle da LV (leishmaniose visceral) depende de um profundo conhecimento do ciclo de vida do parasita e dos aspectos eco-epidemiológicos e clínicos da doença (Andrade, 1997). Já o desenvolvimento de novas formas de diagnóstico, de tratamento e de vacinas depende de um conhecimento detalhado da biologia parasitária, como a organização genômica e a regulação da expressão gênica.

A seleção de um gene ou grupo de genes para um estudo aprofundado em um programa de genômica é sempre difícil, dada a diversidade extraordinária de seqüências e genes disponíveis.

As proteínas de choque térmico ("*heat shock protein*") vêm sendo alvo de estudos nas diversas áreas da biologia celular, já que são responsáveis por diversas funções vitais, tais como o seu potencial imunogênico, frente a determinadas infecções, como já foi observado também no calazar (Andrade, 1997).

Devido ao fato de que membros da família HSP apresentam enorme importância estratégica para o desenvolvimento de vacinas eficazes contra a leishmaniose visceral, fez-se necessária a elaboração de um estudo genômico e pós-genômico das proteínas em questão, dentro de uma abordagem imunológica. Foi realizada a identificação de seqüências protéicas, dentro do banco privado de seqüências geradas pelo Programa Genoma Nordeste (ProGeNE). Os *clusters*, com expressão da HSP de peso molecular de 70 KDa (HSP70), já devidamente caracterizados por Queiroz (2003), com seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos, porções 5' e 3' do gene, bem como as regiões carboxi e amino

terminais da proteína, incluindo o hexapeptídeo imunodominante espécie-específico (EADDRA) da HSP 70.

No presente estudo, foi feita a comparação do *cluster 70*cit, com outras seqüências semelhantes no GenBank, a fim de estudar *in silico*, a característica química dos aminoácidos que compõem o hexapeptídeo imunodominante, espécie-específico, bem como buscar novos epitopos antigênicos *in vivo*. Também foi realizada a identificação dos locais de trans-encadeamento e de poliadenilação da HSP83 e a categorização inicial das primeiras 10.000 seqüências de EST de *L. chagasi*.

1a - Objetivo geral:

- Identificar e caracterizar *in silico* e imunologicamente as regiões protéicas na HSP70 e HSP83 com relevância antigênica, bem como porções que possam representar epitopos lineares para linfócitos B e T, sítios de trans-encadeamento e poli-adenilação na HSP83, baseados em um banco de dados preliminar de 10.000 EST de *L. chagasi* do ProGeNE.

1b - Objetivos específicos:

- Estudar a consistência entre quadro de leitura, expressão e reatividade dos clones de HSP70;
- Analisar a presença do hexapeptídeo EADDRA em HSP70, sua conservação e seu alinhamento com outros tripanosomatídeos;
- Identificar, *in silico*, os prováveis epitopos para linfócitos B e T em HSP70 e HSP83
- Identificar, *in silico*, os locais de trans-encadeamento e poliadenilação em HSP83;
- Investigar a existência de regiões conservadas, próximas aos sinais de trans-encadeamento e poliadenilação em HSP83;
- Analisar a ocorrência dos processos de trans-encadeamento e poliadenilação em HSP83 entre os tripanosomatídeos.
- Analisar, na categorização preliminar das seqüências do ProGeNE, os genes filogeneticamente restritos à família Trypanosomatidae.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Leishmanioses

As leishmanioses constituem um complexo de enfermidades que atingem o homem, causadas por diferentes espécies morfológicamente semelhantes, diferenciadas apenas por métodos bioquímicos, imunológicos, genéticos ou mesmo patológicos. São responsáveis por um amplo espectro de doenças humanas, bem como de natureza veterinária, já que também acomete cães (Ashford, 2001). Estas infecções resultam da multiplicação dos parasitas no sistema fagocítico mononuclear dos vertebrados.

Com base nas características apresentadas pelos pacientes, estas endemias podem ser classificadas em pelo menos quatro formas principais: cutânea (LC), cutânea-difusa (LCD), muco-cutânea (LMC) e visceral (LV) ou calazar (Cimmerman e Cimmerman, 2001).

A maioria das infecções humanas causadas por leishmanias viscerotrópicas é assintomática ou sub-clínica em indivíduos imunocompetentes (Ashford, 2000). As formas clássicas, contudo, caracterizam-se por febre irregular e de longa duração, adinamia, anemia, perda de peso progressivo, edema periférico, esplenomegalia, hepatomegalia moderada ou acentuada, tosse, linfadenopatia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia e hemorragia, sinais e sintomas que podem ocorrer em conjunto ou separadamente (Tesh, 1995). Este quadro clínico, quando não tratado, resulta em supressão imune e infecções secundárias e é causa comum de morte (Stiles *et al.*, 1999).

O calazar canino clássico, por sua vez, é caracterizado por espessamento ou lesões de borda de orelha e focinho, lesões na base da cauda, queda de pelo, hepatoesplenomegalia, acinesia (perda parcial ou total dos movimentos do corpo) e onicogribose (crescimento exagerado das unhas) (Keenan *et al.*, 1984; Genaro, 1993; Neves, 2000).

Estas enfermidades são causadas por parasitas unicelulares flagelados, do gênero *Leishmania*, pertencentes à família Trypanosomatidae, onde todos os seus membros são parasitas de insetos, aracnídeos, plantas ou vertebrados diversos.

Há muitas espécies de *Leishmania*, todas parasitas de vertebrados, porém apenas aquelas que infectam o homem têm recebido bastante atenção dos pesquisadores.

No Novo Mundo, diversas ordens de mamíferos silvestres (reservatórios naturais) e várias espécies de flebotomíneos (vetores) estão envolvidos na transmissão das leishmanioses. A maioria dos casos de infecções humanas está relacionada com hábitos e atividades primárias ou secundárias de indivíduos que exploram ou habitam florestas. Estudos revelam que a reativação de vários focos e o surgimento de novas situações epidêmicas vêm contribuindo para um aumento considerável no número de casos notificados (Martinez *et al*, 1998).

Um outro fator colaborador da expansão das leishmanioses é o crescimento do número de casos de reativações assintomáticas da forma visceral da doença entre portadores de HIV em decorrência da baixa resposta imune destes indivíduos (Roberts *et al*, 2000).

A distribuição geográfica das leishmanioses abrange uma vasta área do Velho e do Novo Mundo, atingindo os países mediterrâneos, a África, a Ásia, as Américas do Sul e Central e algumas regiões dos Estados Unidos (apenas como zoonose)(Nozais, 2003; Werneck *et al*, 2002) (Fig.1). A incidência anual é estimada entre 1,5 e 2,0 milhões de novos casos, provenientes dos 350 milhões de indivíduos que se encontram em situação de risco (WHO, 2000).



Figura 1: Distribuição das leishmanioses visceral (em verde) e cutânea ou tegumentar (em vermelho) no Mundo. No Brasil, as duas formas da doença se sobrepõem em alguns estados (em marrom). As duas endemias ocorrem em áreas tropicais e sub-tropicais, inclusive em torno do Mediterrâneo. A leishmaniose visceral também pode ser encontrada em países de clima relativamente frio, como Portugal, França, Espanha e Grécia e em países dos Balcãs e leishmaniose tegumentar pode ocorrer em países de clima temperado. Fonte: <http://www.wehi.edu.au/research/overview/inf.html>

O aparecimento de novos casos no Brasil e no mundo obedece a uma dinâmica vetorial. Na Tabela 1, encontram-se as espécies de flebotomos vetores das leishmanioses ocorrentes no Brasil, as leishmanias veiculadas e a distribuição geográfica associada (Young e Duncan, 1994).

Tabela 1: Painel eco-epidemiológico das leishmanioses, mostrando o gênero *Lutzomyia*, flebótomos vetores, as espécies de *Leishmania*, com seus respectivos sub - gêneros (*Leishmania* ou *Viannia*), e a respectiva distribuição geográfica nas Américas. A espécie parasitária transmitida pela *L. longipalpis* no Brasil (*L. chagasi*) pode ser um sinônimo de *L. infantum*, agente etiológico do calazar no Velho Mundo.

Vetores suspeitos ou provados	<i>Leishmania sp.</i>	Distribuição
Vários	<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	Belize, até o norte da Argentina
<i>L. umbratilis</i> <i>L. gomezi</i> <i>L. anduzei</i>	<i>L. (V.) guyanensis</i>	Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Brasil
<i>L. ubiquitous</i>	<i>L. (V.) lainsoni</i>	Brasil
<i>L. paraensis</i> <i>L. squamiventris</i> <i>L. ayrozai</i>	<i>L. (V.) naiffi</i>	Brasil
<i>L. whitmani</i>	<i>L. (V.) shawi</i>	Brasil
<i>L. flaviscutellata</i> <i>L. reducta</i> <i>L. olmeca nociva</i>	<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	Panamá, norte da América do Sul
<i>L. longipalpis</i> <i>L. evansi</i> <i>L. antunesi</i>	<i>L. (L.) chagasi (= . infantum?)</i>	Do México ao norte da Argentina

Fonte: Young e Duncan (1994).

2.2 - Leishmaniose visceral (LV) ou calazar

Esta forma clínica é considerada a mais grave entre as leishmanioses, com alta taxa de mortalidade em pacientes não submetidos ao tratamento adequado. Marzochi *et al* (1999) subdividiram o calazar, do ponto de vista clínico, em cinco tipos principais: indiano, chinês, mediterrâneo, africano e neotropical.

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde - OMS (WHO, 2000) são registrados anualmente cerca de 500 mil casos de calazar em todo o mundo, sendo 90% deste total registrados em países como Bangladesh, Índia, Nepal,

Sudão e o Brasil. Este último é responsável por 90% dos casos no continente americano, abrangendo os trópicos e sub - trópicos. No entanto, já foi possível documentar casos de leishmaniose visceral canina no Estado do Texas, nos Estados Unidos (McHugh *et al*, 1996).

Nas duas últimas décadas, tem havido um crescente aumento da incidência do calazar no Brasil, com uma média anual, nos últimos cinco anos, de 3500 casos em 19 Estados, especialmente na região Nordeste (Fundação Nacional de Saúde

FUNASA

http://www.funasa.gov.br/pub/boletim_eletronico_epi/boletim_eletronico_epi_0602.pdf). Nesta região, onde se concentram mais de 90% dos casos humanos da doença, cerca de 70% dos casos humanos ocorrem em crianças com menos de 10 anos de idade (Silva *et al.*, 2001). A taxa de mortalidade estimada é de 10%, caracterizando o calazar infantil como um preocupante problema de saúde pública (Oliveira, 2001; http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/leish_visc/).

Esta enfermidade é encontrada em todas as regiões, com exceção da Região Sul (FUNASA, 2000) (Fig.2)

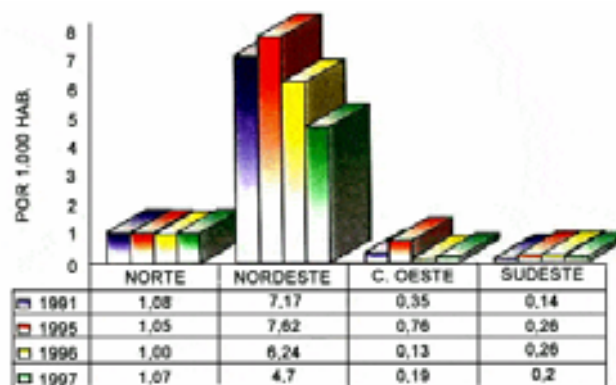


Figura 2: Gráficos representativos da incidência de casos de calazar por região brasileira durante a década de 90, sendo este cenário reproduzido também nos dias de hoje.

Fonte: http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/leish_visc/.

Recentemente, tem ocorrido um aumento significativo nos casos de leishmaniose visceral em áreas peri - urbanas de grandes cidades, particularmente no Brasil (Marzochi *et al*, 1999). Como exemplo dessa “ruralização” da periferia das cidades tem-se a notificação de casos no Nordeste, notadamente em São Luís (MA), Camaçari (BA), Fortaleza (CE), Petrolina (PE), Imperatriz (MA), Teresina (PI) e Natal (RN) (Jerônimo *et al*, 1994). A expansão rumo ao Sudeste do país foi verificada em Belo Horizonte, Sabará e Montes Claros (MG) (Franca-Silva *et al*, 2003), bem como em algumas cidades no interior de São Paulo, como Araçatuba (http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/leish_viscl/).

2.3 - Agente etiológico

Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam uma mitocôndria única (denominada cinetoplasto) rica em DNA, o kDNA, característica dos membros da Ordem. Esta organela localiza-se anteriormente ao flagelo, perpendicularmente ao eixo maior do organismo. Dentre as características morfológicas dos gêneros que compõem a família Trypanosomatidae, encontra-se uma rede de microtúbulos subpeliculares bastante rígida, conferindo a estes protozoários formas celulares bem definidas durante seu ciclo evolutivo (Neves *et al*, 1998).

Os parasitas do gênero *Leishmania* são heteroxênicos e apresentam em seu ciclo de vida apenas duas formas evolutivas: a forma promastigota, que é flagelada e extracelular (Figura 3A) e a forma amastigota, que é intracelular e sem movimentos (Figura 3B). As formas promastigotas apresentam corpo alongado, medindo 18,7µm x 1,6µm e flagelo livre. As formas amastigotas têm corpo ovóide, medindo 3,7µm x 2,1µm e flagelo interno, invaginado (Neves *et al* 1998; Cimerman e Cimerman, 2001).

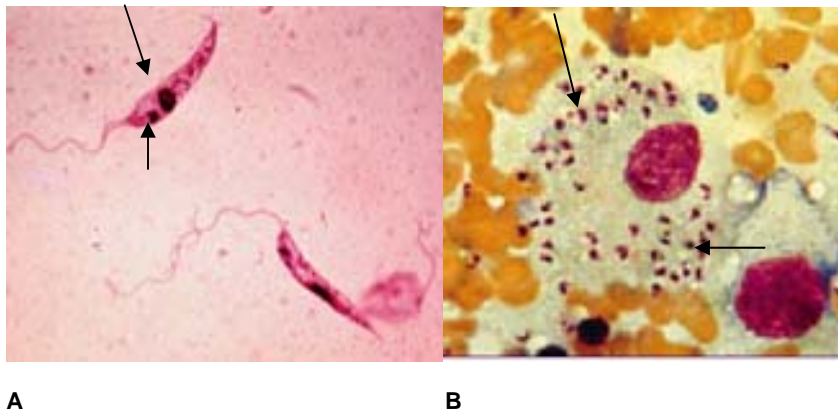


Figura 3A: Promastigotas , formas flageladas de *Leishmania* , com o núcleo ovalado e mais corado (seta) e o cinetoplasto , localizado abaixo da estrutura nuclear (seta menor). Figura 3B: Presença de amastigotas intracelulares (setas) de *L. infantum* infectando o citoplasma do macrófago de hamster. O núcleo da célula hospedeira pode ser visto corado em rosa. Fonte: ([http:// www - medlib.med.utah.edu/parasitology/ldonoim.html](http://www-medlib.med.utah.edu/parasitology/ldonoim.html); www.uiowa.edu/~cemrf/ims/symposiumrecap/symposiumrecap.htm, MaryWilson).

As leishmanias distribuem-se em três espécies distintas: *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*. Alguns autores postulam que *L. chagasi* é somente um sinônimo de *L. infantum*, trazida para as Américas pelos cães dos colonizadores europeus (Maurício *et al*, 2001). A *L. chagasi* é o agente etiológico isolado no homem, em cães e no vetor em casos de leishmaniose visceral no Brasil (Alencar, 1991; Sherlock, 1984). Momem (1987) afirma que a *L. chagasi*, do ponto de vista morfológico e bioquímico, é indistinguível da *L. infantum*, agente causador do calazar no Mediterrâneo e em partes da África e da Ásia. Contudo, no estudo realizado por Lyra (2003), com base em análise computacional de seqüências de HSP70 de *L.chagasi* e *L.infantum*, foi visto que as diferenças são compatíveis com aquelas observadas entre outras espécies de *Leishmania*, sugerindo que estas podem, de fato, representar grupos taxonômicos distintos. Entretanto, este dado não deve ter valor taxonômico conclusivo, já que a investigação foi baseada em um único gene.

A forma promastigota é encontrada no trato intestinal do inseto vetor, tanto livre no lúmen do intestino como ligada pelo flagelo ao epitélio intestinal. Já a forma amastigota é exclusiva do hospedeiro vertebrado e geralmente é

encontrada no interior de macrófagos e outras células fagocíticas (Handman *et al.*, 2000).

2.4 - Ciclo de vida

A infecção em humanos ocorre normalmente em áreas mais pobres, como assentamentos sem condições sanitárias nas periferias de cidades ou em sítios e em populações humanas nutricionalmente carentes. O modo de transmissão usual do parasita é através da picada de dípteros, hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados (Grimaldi *et al.*, 1989).

Somente as fêmeas, independente dos gêneros a que pertencem, são hematófagas (Fig. 4). São insetos geralmente de pequeno porte, que apresentam o corpo e as patas cobertos de cerdas longas e numerosas, freqüentemente misturadas com escamas. Possuem ainda asas longas, densamente revestidas de cerdas, assemelhando o inseto a uma minúscula mariposa. Pertencem ao tipo dos dípteros de atividade crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares úmidos, sombrios e bem protegidos dos ventos (Dias *et al.*, 2003).



Figura 4: Fêmea hematófaga do *Lutzomyia longipalpis* realizando o repasto sanguíneo. Fonte: http://www.niaid.nih.gov/newsroom/focuson_bugborne01/leish-htm

Estes insetos são infectados no momento do repasto sanguíneo realizado em reservatórios, que podem ser o cão domiciliar, a raposa ou outro hospedeiro silvestre. O homem se infecta ao ser envolvido secundariamente no ciclo do parasita (Oliveira, 2001), como observado na figura 5:

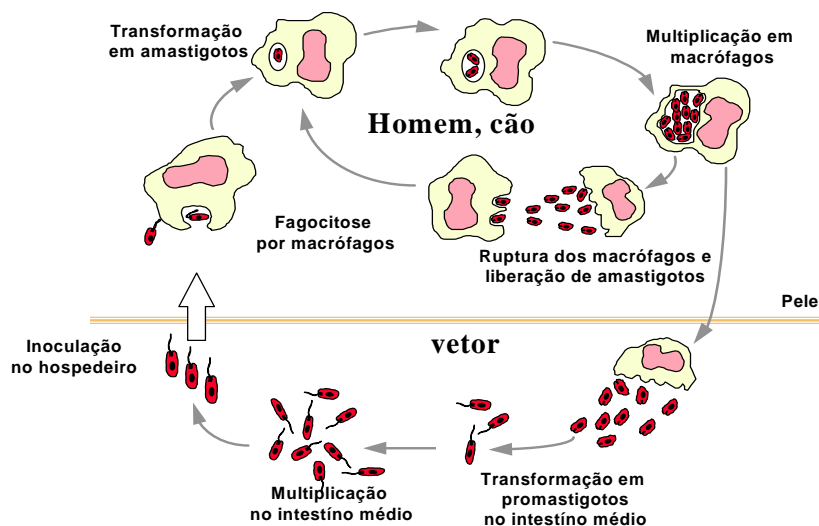


Figura 5: Ciclo de vida da *L. chagasi* mostrando a picada do inseto e inoculação no hospedeiro de formas promastigotas, a interiorização em macrófagos e posterior diferenciação em amastigotas. As amastigotas intracelulares se multiplicam até romperem a célula hospedeira, transformando-se em promastigotas novamente, circulantes no sangue, para então serem capazes de infectar novas células ou infectarem o inseto, no momento do repasto sanguíneo. No interior do intestino médio do inseto, as formas promastigotas se multiplicam e migram para o aparelho bucal, a fim de infectarem o hospedeiro vertebrado novamente, durante o repasto sanguíneo, fechando assim o ciclo evolutivo.

As formas promastigotas procíclicas, extracelulares, não infectantes, se diferenciam em formas infectantes, metacíclicas, no trato alimentar do vetor. Após inoculação no hospedeiro mamífero, os parasitas tornam-se intracelulares, entrando nos macrófagos e diferenciando-se em amastigotas imóveis. Parasitas infectivos são capazes de resistir à ação de enzimas hidrolíticas residentes, inibindo a ativação da explosão oxidativa e minimizando o ataque imunológico do hospedeiro vertebrado (Antoine *et al*, 1998). No que diz respeito à adaptação parasitária na célula hospedeira, é fácil observar que existe um considerável campo de interesse na determinação dos fatores que contribuem para a eficiência

da *Leishmania* como parasita (Bard, 1989; Killick-Kendrick, 1990; Blackwell 1996; Mauel, 1996; Victoir e Dujardin, 2002).

2.5 - Genética de *Leishmania*

Como eucarioto, a *Leishmania* é atípica, já que possui certo grau de similaridade com procariotos no que diz respeito à ausência de íntrons dentro das unidades transcricionais, sendo por este fato, considerada interessante por representar um excelente modelo para o estudo de fenômenos moleculares e celulares da regulação gênica.

As peculiaridades sobre a biologia deste parasita estão sendo melhor entendidas em áreas como a interação entre o sistema imune do hospedeiro e o patógeno, verificados, em ensaios de edição do RNA, a trans-encadeamento do RNAm (Zeiner *et al.*, 2003), proteínas ancoradas por GPI (Smith *et al.*, 1997), variação antigênica (Zambrano-Villa *et al.*, 2002) e organização telomérica (Dujardin *et al.*, 2000, Dujardin *et al.*, 2002; Fu *et al.*, 2002).

No gênero *Leishmania*, a organização dos genes de RNA ribossomais (RNAr) se parece com aquela de outros eucariotos: múltiplos, com repetições *head-to-tail* e regiões codificantes separadas por espaçadores não-transcritos (Requena *et al.*, 1997). Os genes não-ribossomais aparecem em situações de cópia única e de cópias múltiplas repetidas *in tandem*, ou seja, em arranjos seqüenciais, um após o outro, muitos dos quais são transcritos policistronicamente. Genes pareados, por sua vez, são caracterizados por um alto grau de conservação na seqüência peptídica, embora haja uma divergência considerável nas regiões 5'- e 3'- não-traduzidas (5'- e 3'- UTR) de cada gene transcrito, característica talvez relacionada a diferenças em suas regulações (Alonso *et al.*, 1992). Genes não repetidos de funções relacionadas podem também ocorrer em longas unidades transcricionais, semelhante aos operons em procariotos (Stiles *et al.*, 1999). Extensos processamentos pós-transcricionais são requeridos para produzir RNA mensageiros maduros, incluindo o trans-encadeamento da seqüência de 39 nucleotídeos do RNA (mini-exon) (SL - *Spliced*

Leader ou derivado do mini-exon) nas extremidades 5' de todas as moléculas de RNAm. (Zeiner *et al.*, 2003) (Fig.6).

Genes que codificam proteínas altamente expressas, como as α - e β -tubulinas, HSP, proteases, transportadoras, proteínas flagelares e antígenos de superfície, apresentam-se em cópias múltiplas no genoma desses parasitos (Stiles *et al.*, 1999).

Os genomas possuem ainda 30% de seqüências repetitivas, sendo cerca da metade provavelmente proveniente das repetições teloméricas e os restantes 15% resultado de microsátélites, transposons e repetições dispersas de algumas famílias de genes (Rodriguez *et al.*, 1997; Ivens & Blackwell, 1999).

A transcrição policistrônica em tripanossomatídeos de genes contendo apenas exons elimina o requerimento do cis-encadeamento, observado nos eucariotos superiores (Stiles *et al.*, 1999). O pré-RNAm (RNA policistrônico), produzido após co-transcrição a partir de um único promotor 5', por uma polimerase tipo pol II (Clayton, 2001) é, invariavelmente, processado até RNAm monocistrônicos, individuais, de uma forma bimodal: por trans-encadeamento (*trans-splicing*) e poliadenilação. Esses dois eventos parecem ser intrinsecamente acoplados em tripanossomatídeos, reconhecendo sinais regulatórios que consistem em seqüências ricas em polipirimidina (CT) (LeBowitz *et al.*, 1993). Estes eventos transcricionais ocorrem em genes nucleares, exceto aqueles que codificam mini-exon, histonas e RNAr.

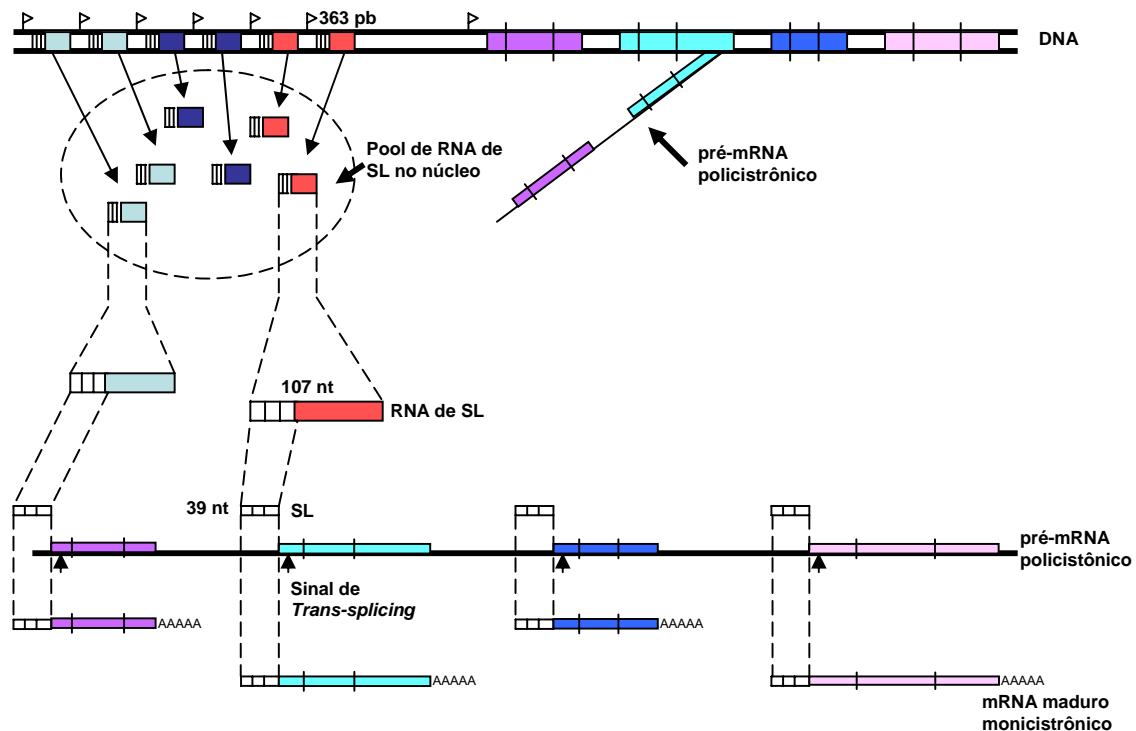


Figura 6: Representação esquemática do processo de transcrição em *Leishmania*. No lado esquerdo da figura está representada a transcrição das três classes de genes que codificam o precursor do mini-exon. Da seqüência original de 363nt do genoma, apenas 107 são transcritos, sendo apenas 39nt transencadeados para a região 5' do mRNA policistrônico. Os processos de trans-splicing e poliadenilação completam a transcrição, produzindo mRNA maduros monocistrônicos. Fonte: Adaptação da figura de Montenegro (2003), baseada nas revisões de Stiles *et al.*, 1999 e Clayton, 2002.

De forma bem característica, o genoma diplóide deste protozoário contém aproximadamente 25 bandas cromossomais visíveis, de tamanhos entre 350 kb a 3 Mb, cobrindo o tamanho do genoma total que é de 35 Mb (Tamar *et al.*, 2000). Brito *et al.* (1998) compararam o número de cromossomo e os grupos de ligação das espécies de *Leishmania* do Velho Mundo com os das espécies do Novo Mundo; apesar da grande maioria dos grupos de ligação serem conservados (32 cromossomos), os membros do subgênero *Viannia* e os do subgênero *Leishmania* provenientes do Novo Mundo apresentam 34 e 35 cromossomos, respectivamente. No entanto, esta variação de tamanho não é observada somente entre espécies, mas também entre as linhagens (Spithill e Samaras, 1987; Scholler *et al.*, 1986; Pagés *et al.*, 1989).

Estas alterações não são, exclusivamente, devido à heterogeneidade clonal das linhagens, mas sim às variações nas cargas das regiões repetidas sub-teloméricas (Blaineau *et al.*, 1991; Bastien *et al.*, 1992; Ravel *et al.*, 1995; Sunkin *et al.*, 2000). A plasticidade do genoma da *Leishmania* pode explicar a habilidade do protozoário em se adaptar aos diferentes ambientes, seja no hospedeiro definitivo seja no intermediário.

O mapa físico do genoma da *L. major* Friedlin foi construído, através de uma biblioteca de cosmídeo de 9216 clones (nove vezes a cobertura do genoma), pela associação de técnicas *fingerprinting*/hibridização após PFGE (eletroforese de campo pulsado). Sendo assim, foi possível não só fazer a ligação dos *contigs*, como também identificar o conjunto de fragmentos representadores do número mínimo exigido de clones para cobrir e completar a análise dos cromossomas individuais (Tamar *et al.*, 2000). A identificação dos cromossomas individualizados de *L. major* pôde ser feita com base nos dados obtidos pela Rede Genômica de *Leishmania*, auxiliada pelo programa de Desenvolvimento das Nações Unidas/Banco Mundial/Organização das Nações Unidas (WHO) (Samaras e Spithill, 1987).

A aplicação de técnicas genéticas padronizadas para estudar *Leishmania* tem sido dificultada por dois fatores: a ausência de um ciclo sexual e a não condensação dos cromossomos nas fases do ciclo celular (Victoir e Dujardin, 2002). No entanto, nos últimos 10 anos, com o refinamento dos métodos de PFGE, foi possível a construção do cariótipo de várias espécies de *Leishmania* (Samaras e Spithil, 1987; Pagés *et al.*, 1989; Bastien *et al.*, 1992; Ivens e Smith, 1997).

A leishmania possui em torno de 60% do seu conteúdo em pares de bases de guanina e citosina (conteúdo G-C), estimando-se a presença de apenas cerca de 8.500 genes (Bastien *et al.*, 1998; Wincker *et al.*, 1997). As regiões codificantes tem um conteúdo GC maior que as regiões não-traduzidas e a 3'- UTR é mais rica em GC que a 5'- UTR (Alonso *et al.*, 1992).

Parsons *et al.* (1991) afirmam que, para *Trypanosoma* spp., porém não ocorrendo em *Leishmania* ou *Crithidia*, o conteúdo GC se correlaciona com o nível de

expressão; por exemplo, genes altamente expressos em *T. brucei* contém um conteúdo GC maior na terceira posição do códon de que aqueles expressos em baixos níveis. O uso de códons sinônimos, denominado de *codon usage*, é influenciado por diversos fatores, tais como níveis de expressão do gene (Moriyama e Powell, 1998; Duret e Mouchiroud, 1999), estrutura secundária da proteína (Gupta *et al.*, 2000; Oresic e Shalloway, 1998) e função do gene (Fuglsang, 2003).

Recentemente, uma comparação entre duas tabelas do uso de códons sinônimos em *L. chagasi*, uma disponível no banco de dados de codon usage (<http://www.kazusa.or.jp>) e a outra confeccionada a partir de dados provenientes do transcriptoma de *L. chagasi* produzidos pelo ProGeNE, foi realizada por Montenegro (2003). Os resultados confirmaram que códons ricos em G e C são mais utilizados nessa espécie, provavelmente devido à distorção do uso de códon naqueles organismos que apresentam conteúdo GC alto.

2.6 - Terapêutica e controle

A droga de escolha para o tratamento da doença é o antimonial pentavalente. No Brasil, é empregado o antimoniato de meglumina, composto sintético, comercialmente designado como Glucantime® e comercializado mundialmente desde 1940. Age inibindo a atividade glicolítica e a via oxidativa (Akhter, 1998) e o tratamento, que leva de 14 a 20 dias, é muito incômodo e algumas vezes é abandonado pelo paciente, pois este sofre com as administrações intramusculares extremamente doloridas, bem como com os diversos efeitos colaterais (náuseas, diarreia, convulsões e alterações no eletrocardiograma) (Herwaldt, 1999). A droga é ineficiente e muito mais tóxica em pacientes co-infectados com o vírus HIV. A explicação mais provável é que os pacientes refratários ao tratamento são, em geral, indivíduos cujo estado imunitário é deficiente (Fichoux *et al.*, 1998). O Glucantime não age senão na medida em que os macrófagos estejam estimulados e o doente comece a se defender contra o parasita (Minodier *et al.*, 2003; Russo *et al.*, 2003).

Um aspecto fundamental no contexto epidemiológico é que as drogas contra leishmaniose usadas na terapia humana não conseguem resposta quando utilizadas em cães, com sua eficácia limitada (Gradoni, 2001). Este mecanismo ainda não está esclarecido, no entanto há estudos em cães no Velho Mundo, onde administrações associadas com alopurinol ocasionaram diminuição das concentrações séricas de proteínas de fase aguda da infecção, como a proteína C reativa e ceruloplasmina (Martinez-Subiela *et al*, 2003).

A droga de segunda escolha para humanos é a anfotericina B, que age nos esteróis e fosfolípidos da membrana celular das várias espécies de *Leishmania* (Akhter, 1998; Ephros *et al*, 1999). É também altamente tóxica e cara, para ser administrada em países em desenvolvimento (Buates e Matlashewski, 1999).

Na medida em que já são relatados inúmeros casos de resistência, uma nova droga surge como sendo extremamente promissora. É a miltefosina, de uso oral, em fase final de avaliação em voluntários do exército indiano (Guerin *et al.*, 2002).

Outra abordagem primordial é o desenvolvimento de uma vacina para o calazar. No entanto, esta estratégia ainda não está disponível devido ao fato de que inúmeros mecanismos imunológicos ainda precisam ser melhor esclarecidos, tais como: a imunidade aparente conferida ao indivíduo após o tratamento seguido de cura, a droga de escolha e o mecanismo de defesa imunológica do grande número de indivíduos infectados e assintomáticos das áreas endêmicas (Moddaber, 1995).

No que se refere ao controle epidemiológico, com a participação direta no combate ao vetor, verifica-se que as mudanças ambientais e distúrbios ecológicos interferem decisivamente no balanço ecológico das áreas atingidas pela leishmaniose visceral, principalmente por romper a estabilidade existente entre as populações de insetos vetores, parasitos e reservatórios nelas encontradas (Patz *et al.*, 2000). Desta forma, o aumento no número de casos registrados, na última década, pode ser parcialmente explicado por modificações sócio-ambientais, tais como desmatamento e processos migratórios (Aguilar *et al.*, 1998), aliadas ao fenômeno da “ruralização” da periferia das cidades, já anteriormente relacionado.

Por outro lado, o número médio de casos de LV em regiões rurais tem permanecido inalterado (Silva *et al.*, 2001).

O controle da LV tem se mostrado um grande desafio para as autoridades em saúde pública e para os cientistas voltados ao desenvolvimento de novas tecnologias, dependendo de um profundo conhecimento do ciclo de vida do parasito e dos aspectos eco-epidemiológicos e clínicos da doença (Andrade, 1997). No Brasil, o PCLV – Programa de Controle da Leishmaniose Visceral, criado desde 1970 pelo Ministério da Saúde, utiliza três principais medidas no controle da doença, como: aplicação de inseticidas residuais nas áreas endêmicas do vetor, diagnóstico precoce e tratamento dos pacientes e identificação e eliminação dos cães infectados. Entre as mais recentes recomendações do PCLV está a mudança do enfoque principal de atuação de intervenção, deixando de ser sobre o cão, como tradicionalmente vinha acontecendo, e passando a ser sobre o vetor. Esta nova perspectiva de controle vetorial obedece a uma política descentralizada, onde o Estado e/ou Município desenvolvem as suas campanhas de borrifação adequadas às necessidades locais, sem depender exclusivamente da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA, 2000).

2.7 - Resposta imune no calazar

É extremamente complexo o mecanismo imunológico do calazar, mas é exatamente dessa resposta que depende a evolução da infecção. Quando promastigotas entram em contato com o hospedeiro, o mesmo responde com processos mediados pelo complemento. Porém, esses protozoários utilizam os receptores do sistema complemento para efetuar a penetração nos macrófagos, evitando assim sua destruição pelos produtos tóxicos dessa via (Roit *et al.*, 1999). Depois de instituída a interação com os macrófagos, esses parasitas conseguem sobreviver ao processo de fagocitose e resistir ao ambiente ácido, rico em proteases do fagolisossoma (Bogdan e Roellinghoff, 1998). Foi a partir desses mecanismos de resistência tão eficazes, que a *Leishmania* conseguiu tão alto sucesso evolutivo, mantendo-se como parasita intracelular obrigatório (Victoir e Dujardin, 2002).

A progressão da leishmaniose visceral está relacionada com a ativação das células CD4⁺ Th2 (Skeiky *et al.*, 1997) que aumenta a sobrevivência do parasita e exacerba as lesões (Abbas *et al.*, 2000). Essa população celular sintetiza as citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 (interleucinas) e é responsável pela ativação de células B para a produção de anticorpos (Cox, 1997). A expressão dessas citocinas associadas às células Th2 suprime a proliferação e função das células CD4⁺ Th1 (Mossalayi *et al.*, 1999; Skeiky *et al.*, 1995), produtoras de interferon – gama (IFN- γ), IL-2 e IL-12, que conferem aumento da resistência do hospedeiro (Gomes *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1995). Outras funções atribuídas as citocinas do grupo Th1 compreendem a ativação do complemento e a opsonização para as células fagocitárias, visando a ativação dos macrófagos e destruição do parasita (Gama *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2003).

Em áreas de transmissão de *L. chagasi*, a maioria dos infectados desenvolve um quadro assintomático ou sub-clínico de infecção, que está associado à síntese do IFN- γ . O desenvolvimento da leishmaniose visceral é caracterizado por uma baixa produção dessa citocina, que é considerada o mais importante ativador de macrófagos, células fagocíticas profissionais, para destruir os parasitas (Costa *et al.*, 1999).

2.8 - Imunidade pós-tratamento

Após a quimioterapia bem sucedida, o indivíduo clinicamente curado está aparentemente imune. Neste caso, observa-se um mecanismo de proteção no calazar e que poderia em princípio ser explorado no desenvolvimento de uma vacina. Deve-se ter em mente, contudo, que a maioria, senão todas as vacinas existentes contra agentes infecciosos, e já aprovadas para uso humano, foram desenvolvidas sem o conhecimento dos detalhes dos mecanismos de proteção envolvidos ou a natureza dos antígenos (ou epitopos) protetores (Andrade, 1997). Uma abordagem empírica conduzida em cães, como modelo mais próximo e epidemiologicamente relevante, já foi citada e administrada com sucesso por Coqueiro (1996) e Queiroz (2001). Abordagens como esta podem levar ao

encontro de uma vacina mais rapidamente do que pelo detalhado estudo da imunidade pós-tratamento.

No caso da imunidade pré-infecção ou nos casos de resistência clínica ao parasita (indivíduos assintomáticos de área endêmica), pode haver um número pequeno de antígenos envolvidos na imunidade provavelmente mediada por linfócitos T. Um estudo mais aprofundado sobre estes prováveis antígenos desencadeadores de imunidade possibilitaria o controle epidemiológico do calazar com a utilização de uma vacina eficaz. Badaró *et al.* (1986) já haviam testado vacinas molecularmente definidas, com HSP70 e HSP90 recombinantes (proteínas de choque térmico), *in vitro*, onde foi observada uma resposta imune celular dos indivíduos assintomáticos de área endêmica, com produção de IFN γ e IL-12.

Em ensaios com HSP70 recombinante, tendo alúmina e CFA como adjuvantes, em imunizações de camundongos e coelhos, foi observado que a proteína mostrava-se um forte imunógeno, induzindo a produção de anticorpos com doses reduzidas do antígeno (Andrade *et al.*, 1990; Moura, 1994; Silva, 1995).

2.9 - Proteínas de choque térmico (HSP)

Estas proteínas são chamadas de choque térmico porque foram primeiramente descobertas em células expostas a altas temperaturas (MacFarlane *et al.*, 1990; Polla, 1991; Rico *et al.*, 1998), bem como altas concentrações de íons, gases e várias substâncias tóxicas (Rico *et al.*, 1999). Os representantes desta família multigênica, que contém membros constitutivos e indutíveis, são conservados na escala evolutiva desde procariotos mais primitivos até organismos mais complexos, multicelulares (Quijada *et al.*, 1997; Eden e Young, 1996; Coronato, 1999; Salotra, 1995). Além da conservação e abundância, as HSP possuem características comuns como atividade ATPásica e uma habilidade para ligar e liberar segmentos hidrofóbicos de cadeias de polipeptídeos desdobrados (Kelley, 1998).

Em eucariotos elas podem ser encontradas tanto no citosol como em organelas do tipo mitocôndria, cloroplasto e retículo endoplasmático. (Minowada e Welch, 1995, Garlapati *et al.*, 1999; Requena *et al.*, 2000).

Os genes e seus produtos fazem parte de famílias, que são baseadas na similaridade das seqüências e no peso molecular: HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, HSP10 e a família das pequenas HSP (15-30 kDa) (Feder e Hofmann, 1999). Essas proteínas desempenham função de chaperonas, isto é, remodeladoras de proteínas, no momento de síntese protéica ou em resposta ao estresse celular, auxiliando no enovelamento necessário para a funcionalidade da proteína e evitando a sua desnaturação. A fim de garantir a funcionalidade de eventuais proteínas defeituosas, as HSP reconhecem a estrutura alterada, reparam, montam e translocam peptídeos alterados através da membrana celular (Alberts, 1997), como pode ser observado na figura 7, com a ação das chaperonas durante a síntese protéica.

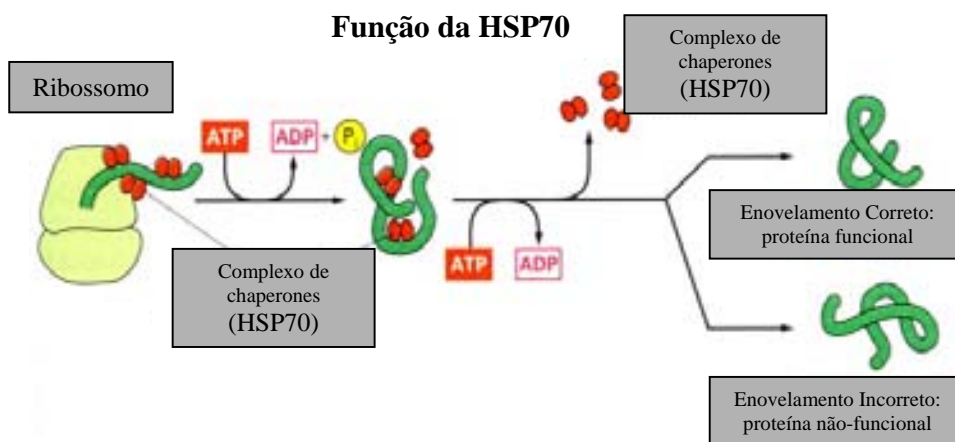


Figura 7: Atuação das HSP70 sobre o enovelamento das proteínas recém sintetizadas no ribossomo. As chaperoninas ligam-se ao polipeptídeo formando uma série de complexos de ligações, com gasto de duas moléculas de ATP, auxiliando no enovelamento funcional da proteína. Figura adaptada do site: <http://www.med.hokudai.ac.jp/~bio-1w/kogi/files/6-83.jpg>.

No que se refere ao transporte do citosol para a mitocôndria, as chaperoninas mitocondriais transportam a proteína, já com a configuração desdobrada e estabilizada, auxiliando o enovelamento funcional da mesma (Fig.8).

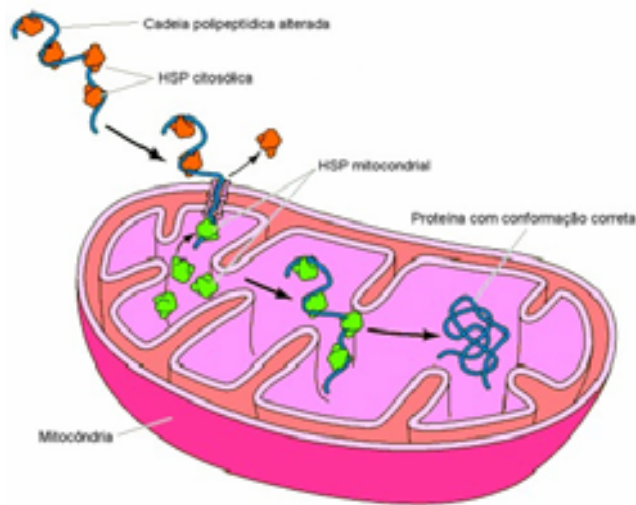


Figura 8: Ação das chaperoninas durante o transporte proteico. O polipeptídeo parcialmente desdobrado é transportado do citosol para a mitocôndria. Chaperoninas citosólicas (em laranja) estabilizam a configuração desdobrada e as proteínas mitocondriais (em verde) facilitam o transporte e, subseqüentemente, o dobramento da cadeia polipeptídica dentro da organela. Fonte: Suzue e Young (1996).

Observa-se a participação destas proteínas no mecanismo de tolerância a hipóxia, a endotoxinas, à radiação ultravioleta, proliferação celular, resistência ao peróxido de hidrogênio, resistência de células tumorais a monócitos, entre outras funções (MacFarlane *et al.*, 1990). Elas desempenham importante papel também nas interações proteína-proteína, incluindo modelagem, conformação, prevenção de agregação protéica imprópria, como já mencionado anteriormente, através de um domínio carboxi-terminal de 27 kDa, que se liga a motivos de 6 aminoácidos hidrofóbicos (Zhu *et al.*, 1996).

Estas moléculas têm também um papel crítico em processos imunes normais bem como na geração de respostas imunes específicas (Gunther, 1991; Haas, 1991; Kaufmann, 1990; Pierce *et al.*, 1991). Entre as parasitoses, a propriedade antigênica das HSP foi inicialmente detectada na malária e esquistossomose (Bianco *et al.*, 1986; Nene *et al.*, 1986; Zhang *et al.*, 2001).

Dentre as várias habilidades de natureza antigênica das proteínas de choque térmico podemos citar a interação com células apresentadoras de antígenos (APC) via receptores, estimulação das APC a secretarem citocinas inflamatórias e

mediação da maturação de células dendríticas. Estas propriedades também permitem que as HSP sejam utilizadas em uma nova geração de vacinas profiláticas e terapêuticas contra câncer e doenças infecciosas (Srivastava e Amato, 2001). Possivelmente as propriedades imunogênicas das HSP estão restritas, em grande parte, à sua região C-terminal, onde apresentam as seqüências mais divergentes entre si (Kaufmann, 1990; Skeiky *et al.*, 1995).

As famílias que foram estudadas neste trabalho são as de peso molecular de 70 kDa (HSP70) e a de 83 kDa (HSP83), pertencente à família da HSP90, bem como a resposta imune anti - HSP70 na leishmaniose visceral humana.

2.10 – Proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP 70) e a resposta imune

A proteína de choque térmico de peso molecular 70 kDa contém dois domínios principais, o domínio ATPase N – terminal que é mais conservado (cerca de 64% entre HSP70 de eucariotos), enquanto a parte C-terminal é ocupada por domínio mais variável que liga peptídeos. Estas regiões são ligadas por sítios protease-sensíveis (Kelley, 1998).

As proteínas pertencentes à família das HSP 70 tanto auxiliam para garantir um dobramento adequado das cadeias polipeptídicas quanto desempenham uma função essencial na importação de proteínas para as mitocôndrias e para o retículo endoplasmático, ligando-se à proteína precursora, sem sua conformação nativa, durante o transporte. A liberação de polipeptídeos recentemente sintetizados pela HSP70 necessita de hidrólise de ATP. Essa requisição energética é imprescindível durante os estágios subseqüentes de importação para a mitocôndria (Kelley, 1998).

A função da HSP70 na defesa celular, parece estar baseada na sua capacidade de associar-se com outras proteínas, de modo que modifique o destino e a função. (Rico *et al.*, 1999).

A HSP70 é expressa como um mecanismo de defesa celular de parasitas, possibilitando a sobrevivência destes organismos, em diferentes condições de estresse, especialmente térmico, às quais o organismo é exposto ao longo do seu ciclo de vida (Tsuji *et al.*, 1997).

No gênero *Leishmania*, a HSP70, assim como a HSP83, estão envolvidas no processo de diferenciação celular de promastigotas para amastigotas, porém a base molecular deste processo ainda não está esclarecida (Bente *et al.*, 2003).

As HSP70, embora codificadas pelo genoma nuclear, podem estar presentes em várias organelas, inclusive na mitocôndria. Neste compartimento elas são identificadas pela presença de um peptídeo sinal característico na sua extremidade amino terminal. A região amino-terminal da HSP70 possui grande homologia com a HSP70 de origem procariótica, a DNAK em *E. coli*, refletindo assim a possível origem procariótica da mitocôndria e a transferência de genes mitocondriais para o genoma nuclear (Engman *et al.*, 1989; Searle *et al.*, 1993; Effron *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2001).

Os genes desta família multigênica compreendem um número variável de membros, geralmente acima de 3 genes, como ocorre na HSP70 de *L. infantum*, que é codificada por 6 genes (Quijada *et al.*, 2000).

Assim como a HSP70 citosólica, a sua homóloga mitocondrial parece também ter alguma propriedade imunogênica (Louzir *et al.*, 1994; Krautz *et al.*, 1998).

Dentre as famílias das HSP, a HSP70 representa uma das mais expressas e de maior propriedade imunogênica, desempenhando um possível papel na indução da resposta imune protetora contra as leishmanioses (Andrade *et al.*, 1992; Brandau *et al.*, 1995; Rico *et al.*, 1999; Rey-Ladino *et al.*, 1997). A ação desencadeante na resposta imune inata já foi estudada bem como a verificação da expressão aumentada em certos organismos, promovendo a imunopatologia. Evidências mostram que esta chaperonina pode ter um potencial imunoterapêutico, já que em ensaios com a proteína purificada, de células neoplásicas e infectadas com vírus, podem transferir ou entregar peptídeos antigênicos para células apresentadoras de antígenos, desencadeando uma resposta imune específica (Todryk *et al.*, 2003).

Várias abordagens contra a leishmaniose têm sido desenvolvidas com o objetivo de se buscar uma resposta imune protetora através do uso de proteínas e no tratamento com drogas antimoniais e quimioterapia (que por sua vez são

altamente tóxicos ao homem). Frações protéicas de *L. infantum* ou *L. major*, cujos componentes têm peso molecular variando de 67-94 kDa, foram utilizadas em experimentos de imunizações de camundongos BALB/c, desencadeando resistência contra *L. major* e *L. mexicana* em posterior infecção com os parasitas (Frommel *et al.*, 1988). Em outra abordagem, uma fração protéica purificada de *L. braziliensis* (LbbF2) foi testada por Monjour *et al.* (1994) em ensaio de imunoterapia com pacientes do Estado de Pernambuco acometidos de leishmaniose cutânea. Sua taxa de cura se mostrou equivalente àquela de pacientes sob quimioterapia, com desenvolvimento de resposta imune celular, constituindo-se na resposta ideal para a eliminação da *Leishmania*.

As duas HSP mitocondriais já caracterizadas e melhor descritas em tripanosomatídeos são as Mtp70 de *T. cruzi* (cinetoplasto) codificadas por duas cópias de um gene nuclear (Engman *et al.*, 1989 e Engman *et al.*, 1992) e a MP 70.1 de *L. major* (matriz mitocondrial) (Searle *et al.*, 1989). A hipótese de que estas proteínas são codificadas por genes diferentes e que podem vir a ter funções distintas no interior da mitocôndria foi proposta por Nascimento (2001).

2.11 - Resposta anti-HSP70 no calazar

A prerrogativa de que a HSP70 se apresentaria como importante imunógeno no calazar, indutora de anticorpos em indivíduos infectados e em animais imunizados contra células irradiadas foi sugerida por Hedstrom *et al.* (1987). No entanto, a prova efetiva da antigenicidade das HSP entre os tripanosomatídeos só foi obtida mais tarde (MacFarlane *et al.*, 1990; Andrade e Andrade, 1990), quando foi demonstrado que o soro de pacientes com calazar continha anticorpos dirigidos contra antígenos homólogos à família.

Na regulação dos genes induzidos de HSP70 em *L. chagasi*, em contraste com o que acontece em eucariotos superiores, a quantidade de proteína produzida pelo parasita não é regulada pelo nível estável do RNA total de HSP70 (Andersen *et al.*, 1996). No hospedeiro vertebrado, a proteína parasitária funciona como potente imunógeno desencadeador de resposta imune específica (Maresca

e Kobayashi, 1994), conferindo a HSP a imunogenicidade necessária para o desenvolvimento de uma vacina (Newport, 1991).

A atividade imunoestimulatória da HSP70 no calazar vem sendo bastante investigada (Quijada *et al.*, 1996; Rico *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2001). O potencial mitogênico da HSP70 e HSP83 de *L. infantum* já foi demonstrado em esplenócitos murinos, com efeito direto em populações de linfócitos B, tanto em proteínas recombinantes como fusionadas com MBP (proteína ligadora de manose (Rico *et al.*, 2002).

A modulação da HSP70 do macrófago na infecção pela *L. donovani* já foi estudada (Adhuna *et al.*, 1997), demonstrando-se o possível papel da proteína do hospedeiro na diferenciação e sobrevivência durante a infecção.

Andrade (1997) observou que pacientes e cães com calazar têm grandes quantidades de anticorpos contra HSP70 de *Leishmania*. Porém, ao se imunizar cães com HSP70, não se observou uma resposta humoral clara, somente uma resposta celular, medida pela intradermorreação.

A resposta imune celular anti-HSP70 na leishmaniose visceral foi também descrita (Carvalho, 1993 e Costa *et al.*, 1999), onde a proliferação de linfócitos T de pacientes assintomáticos em resposta à proteína de choque, desencadeou a produção de IFN γ , mas não de IL-4, sugerindo o potencial imunogênico da HSP70 *in vivo* e o seu envolvimento num mecanismo de resistência observado nos indivíduos assintomáticos.

Estudos realizados por Queiroz (2001), com vacinação experimental de 2000 cães com HSP70 recombinante, mostraram que um elevado grau de proteção podia ser alcançado contra o desafio natural pela *L. chagasi*, em área endêmica, comprovando o papel imunogênico e protetor da HSP70.

O hexapeptídeo imunodominante EADDRA, proposto inicialmente por Wallace *et al.* (1990), como sendo espécie-específico em *L. donovani*, também foi localizado na porção carboxi-terminal da proteína de choque térmico de *L. chagasi* por Andrade (1997) e teve o seu perfil antigênico estudado frente a soros de pacientes com calazar.

2.12 - HSP 83 do gênero *Leishmania* e a resposta imune

A família das HSP90 (HSP83 - HSP90) são abundantes e presentes em procariotos e eucariotos. Sua localização é citoplasmática, algumas vezes nuclear, ligando-se ao envelope nuclear de células permeabilizadas. (Schlatter *et al.*, 2002). Em eucariotos superiores e em leveduras, a HSP83 citosólica tem sido conhecida por interagir diretamente com fatores de transcrição, dependente de ligante e reguladores do ciclo celular (Rutherford e Zuker, 1994; Scheibel *et al.*, 1998; Buchner, 1999).

Além da função mais geral, como remodeladoras moleculares, as proteínas da família HSP90 também são estudadas há muito tempo, por serem antígenos imunodominantes reconhecidos pelo sistema imune em várias doenças infecciosas, como malária, esquistossomose, triquinelose, toxoplasmose (Bonney *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 2000). Por sua propriedade de se ligar a várias proteínas tumorais e proteínas produzidas por vírus, estão sendo utilizadas no desenvolvimento de vacinas para vários tipos de câncer e doenças virais (Helmbrecht *et al.*, 2000).

No gênero *Leishmania*, a HSP83 é uma das proteínas mais abundantes, constituindo 2,8% das proteínas celulares (Brandau *et al.*, 1995), sendo codificada por múltiplas cópias do gene, como no caso da proteína de *T. brucei*, com 12 genes (Mottram *et al.*, 1989) e encontrada na fração solúvel do citoplasma (Shapira e Pinelli, 1989; Brandau *et al.*, 1995; Hubel e Clos, 1996). Também é conhecido o seu papel controlador da homeostase nos estágios de diferenciação celular em *L. donovani* e *T. cruzi* (Wiesgigl e Clos, 2001; Graefe *et al.*, 2002; Bente *et al.*, 2003).

A HSP83 possui alto nível de conservação entre tripanosomatídeos, com 84% de identidade entre *L. mexicana amazonensis* e *T. cruzi* (Shapira e Pedroza, 1990), bem como entre outros organismos, com 64% de identidade entre humanos e leveduras e 40% entre humanos e *Escherichia coli* (HtpG)(Requena *et al.*, 2000). É abundante em formas amastigotas e promastigotas quando expostas ao estresse térmico.

2.13 - HSP83 e a resposta imune no calazar

Promastigotas de *L. donovani* quando submetidos, também a alteração de pH aumentam a síntese de HSP83 e HSP70, bem como a sua virulência (Salotra *et al.*, 1994, Salotra *et al.*, 1995). Esta proteína, além de possuir papel importante na virulência e diferenciação celular, também está presente na resposta imunológica provocada por outras espécies de *Leishmania*.

Uma forte resposta humoral em camundongos BALB/c foi observada em imunizações de HSP83 de *L. infantum* fusionada com MBP (proteína ligadora de maltose), demonstrando o seu papel carreador de antígenos fusionados, em vacinações livres de adjuvantes (Echeverria *et al.*, 2001; Requena *et al.*, 2000). Em ensaios com HSP83 recombinante foi observada a estimulação da proliferação de células esplênicas murinas (Rico *et al.*, 1999), bem como a produção de IgG4 provocada por HSP83 de *L. amazonensis*. (Skeiky *et al.*, 1997).

Anticorpos contra membros da família das HSP83 também têm sido encontrados em doenças infecciosas causadas por diferentes patógenos como: *Candida albicans* (Matthews e Burnie, 1992), *Schistosoma mansoni* (Johnson *et al.*, 1989), *Plasmodium falciparum* (Jendoubi e Bonnefoy, 1988), *Leishmania donovani* (Andrade *et al.*, 1992), *Leishmania braziliensis* (Skeiky *et al.*, 1995) e *Trypanosoma cruzi* (Dragon *et al.*, 1987).

A HSP83 de *L. infantum* já foi relatada como antígeno imunodominante no calazar canino (Angel *et al.*, 1996). Ao contrário do que ocorre com a proteína em *S. mansoni*, onde a região carboxi-terminal tem sido apontada por conter a maioria dos epitopos imunogênicos (Johnson *et al.*, 1989), em *L. infantum*, o principal determinante antigênico parece estar localizado na porção amino-terminal, em uma região de baixa conservação de seqüências, sendo referência de possíveis candidatos para o sorodiagnóstico no calazar canino (Angel *et al.*, 1996).

2.14 - Vacinas em andamento

Um dos maiores desafios científicos é o desenvolvimento de uma vacina segura que proteja o hospedeiro e não cause efeito adverso. O entrave gira em torno da dificuldade do sistema imune do hospedeiro em responder com eficiência à infecção parasitária e também devido à ausência de um tratamento adequado.

As estratégias que permeiam o desenvolvimento de uma vacina para doenças infecciosas são baseadas em questionamentos tais como: quais moléculas serão usadas como antígeno? Qual a via de administração? Qual adjuvante será escolhido? Qual o tempo necessário para a imunidade satisfatória? (Cox, 1997).

2.14.1 - Vacinas de primeira geração

São produzidas com parasitas inativados pelo calor. No Brasil, Mayrink *et al.* (1979) utilizaram um sonicação de cinco diferentes linhagens de leishmanias e conseguiram reverter o teste de Montenegro (intradermorreação com promastigotas inativados pelo calor) em apenas 50% dos indivíduos. Este estudo deu início à produção comercial de uma vacina composta por uma linhagem de *L. amazonensis*, a LEISHVACIN[®] (Biobrás, S/A) (Engers *et al.*, 1996). Esta vacina, no momento, está sendo desenvolvida com o uso de adjuvantes (Follador *et al.*, 2002).

2.14.2 - Vacinas de segunda geração

São sub-divididas em três categorias:

- Vacinas em organismos vivos – Produzidas em bactérias recombinantes ou vírus expressando antígenos leishmaniais. A fim de produzir uma vacina oral, Xu *et al.* (1995) utilizaram *Salmonella typhimurium* expressando o gene que codifica GP63 de *L. major*, a qual desenvolveu uma resposta Th1 em camundongos.
- Vacinas de sub - unidades definidas - Utilização de moléculas antigênicas recombinantes. Uma das mais usadas é a GP63, testada como vacina em murinos, associada a adjuvantes, mostrando bons

resultados contra a leishmaniose (Frankenburg *et al.*, 1996). A LACK, (receptores para quinase C ativada de *Leishmania*), também tem se mostrado um potente imunógeno em camundongos, quando administrada com a IL-12.

- Frações antigênicas – Principal linha de pesquisa do TDR (*Research and Training in Tropical Disease*), como detalhado a seguir.

A elaboração de uma vacina de segunda geração para *Leishmania* tem sido parte das atividades do TDR (www.who.int/tdr) por vários anos, já tendo sido organizado um estudo comparativo de nove antígenos recombinantes identificados. As frações antigênicas recombinantes testadas e avaliadas até o momento foram desenvolvidas apenas com espécies causadoras de leishmaniose tegumentar e *Trypanosoma brucei*. Essa abordagem faz parte do programa de vacinas de 2ª geração/TDR e encontram-se em teste, em diferentes fases de execução.

Entre os antígenos escolhidos para programa de vacinas de 2ª geração/TDR, encontra-se um representante da família HSP90, a HSP83 de *L. braziliensis*, apresentada sob forma de mistura com outros antígenos (LACK, TSA, GP63 e FPA) ou isoladamente (Tabelas 2 e 3) (Skeiky *et al.*, 1997). Porém, não foi observado efeito considerável quando administrada individualmente nos dois laboratórios onde foi avaliada, no entanto quando administrada com outros antígenos e com IL-12 como adjuvante mostrou-se satisfatória (Tabelas 2 e 3):

Tabela 2: Lista de antígenos recombinantes testados pelo programa TDR, na qual há apenas uma proteína HSP, a HSP83 de *L. braziliensis*, apresentada na forma de mistura (asterisco) com outros antígenos ou isoladamente (em negrito).

<u>ANTÍGENO</u>	<u>DESCRIÇÃO</u>
<u>Mistura*</u>	<u>LACK, HSP80, TSA, GP63 e FPA</u>
<u>TSA</u>	<u>Oxidante tiol-específico de <i>L. major</i> (Coler et al., 2002)</u>
<u>GP63</u>	<u>Leishmanolisina de <i>L. major</i> (Mahboudi et al., 2001)</u>
<u>HSP80</u>	<u>HSP83 de <i>L. braziliensis</i> (Skeiky et al., 1997)</u>
<u>SLA</u>	<u>Antígeno solúvel de <i>L. major</i> (Lee et al., 2000)</u>
<u>LACK</u>	<u><i>L. major</i> (Hofman et al., 2003)</u>
<u>FPA</u>	<u>Antígeno da bolsa flagelar de <i>T. b. rhodesiense</i> (Mkunza et al., 1995)</u>
<u>1G6</u>	<u><i>L. major</i></u>
<u>4H6</u>	<u><i>L. major</i></u>
<u>GBP</u>	<u>Proteína do gene B de <i>L. major</i> (Jensen et al., 1999)</u>

Fonte: www.who.int/tdr/prd/leish/vac/01.1

Além do programa vacinal financiado pelo TDR, outros estudos imunológicos estão sendo desenvolvidos baseados em outras proteínas antigênicas de *Leishmania*. A glicoproteína de 46 kDa quando foi utilizada em programas de imunizações desencadeou certa proteção contra infecção de *L. amazonensis* (Myung et al., 2002) e as cisteína proteinases recombinantes (tipos I e II) de *L. infantum* foram fortemente reconhecidas pelo soro de pacientes com calazar (Rafati et al., 2003). Algumas proteínas além de reduzir a carga parasitária no baço de camundongos, como a proteína A2 de *L. donovani* (Coelho et al., 2003) desenvolvem proteção e desencadeiam redução do número de parasitas no fígado murino, como ocorre com as proteínas HASPA, HASPB e SHERP (McKean et al., 2001) e antígeno FML de *L. donovani* (Palatinik et al., 1995).

Foi realizada pelo GENTROP/UFPE, em Natal (RN) a única apresentação vacinal experimental aplicada contra *L. chagasi* que se tem conhecimento até o momento (Queiroz, 2001). Para as imunizações foi usada uma fração carboxi-

terminal da proteína de choque térmico recombinante, de peso molecular de 70 kDa (HSP70) em 2000 cães, residentes em área endêmica. Um elevado grau de proteção pôde ser alcançado contra o desafio natural pela *L. chagasi*, na medida em que foi gerada uma resposta celular, comprovando o papel imunogênico e protetor da HSP70 (Manuscrito em preparação).

Estes ensaios vacinais em cães possuem grande importância epidemiológica, na medida em que são o principal reservatório para a *L. chagasi* em países endêmicos. No entanto, alguns pontos devem ser considerados para a elaboração de uma vacina para cães, tais como a indução de uma alta resposta Th1, o estudo aprofundado dos adjuvantes em cães, a comparação entre os efeitos da vacina da fase II e fase III, sua proteção duradoura contra a infecção e não somente da doença. Esta questão é importante, pois mesmo com ausência de sintomas clínicos (longo período de incubação), o cão continua sendo fonte de transmissão para o vetor.

Também estão sendo testadas as vacinas de DNA, que têm se mostrado capaz de induzir atividade protetora em modelos de infecção (Gradoni, 2001). Entretanto, esta técnica ainda precisa ser mais bem detalhada, devido ao pouco conhecimento de seus mecanismos de ação e dos riscos desconhecidos que esse tipo de vacina poderia gerar.

2.15 - Genomas de parasitas

Nos últimos anos, as pesquisas em genética molecular trouxeram contribuições de importância relevante e com o avanço da era genômica, diversos organismos, como vírus, bactérias, helmintos, plantas, fungos e protozoários, estão com seus genes em fase de sequenciamento ou já finalizados. (www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes).

Para um modelo inicial de sequenciamento do genoma da *Leishmania*, foi utilizada a linhagem virulenta Friendlin de *L. major*. O projeto, que está sendo desenvolvido pelo *Leishmania Genome Network* (LGN) (<http://www.ebi.ac.uk/parasites/leish.html>), localizado no *Sanger Centre* (Inglaterra), tem como alvo a resposta de um grande número de questões

biológicas sobre o parasita, devendo apresentar resultados de grande impacto para a doença e servindo de referência para o sequenciamento das outras espécies deste mesmo gênero. Este projeto, criado em 1994, representa um enorme avanço na área da genética de tripanosomatídeos e encontra-se com uma grande parte do mapa físico construído, com alguns cromossomos (1,3,4,5 e 24) já seqüenciados e outros em andamento (www.sanger.ac.uk).

Existem duas categorias de projetos de seqüenciamento de DNA: os que cobrem genomas completos (como o pioneiro para *L. major*) e os que se baseiam apenas nos genes expressos (EST - *Expression Sequence Tags*). Ambos revelam desvantagens, como, por exemplo, a existência de seqüências de DNA nos genomas de eucariotos que não se expressam, sem significado funcional estabelecido (como DNA repetitivo, introns, etc) e que não são abordados em um programa de EST. No caso de projetos de EST, a crítica gira em torno da inexistência de dados sobre os elementos reguladores (Wolfsberg e Landsman, 2001). No entanto, afastadas as desvantagens, há diversos projetos de seqüenciamento de DNA em andamento, que contemplam tanto EST como genomas completos, representando um método rápido e eficiente para a identificação e caracterização *in silico* de genes.

No Brasil, em meados de agosto de 2000, foi formado um grupo de pesquisadores, composto por colaboradores em dezesseis instituições de nove Estados do Nordeste do país, para a realização do estudo genômico da *L. chagasi*, que tem como objetivo elucidar as questões biológicas para esta espécie. O Programa Genoma Nordeste (ProGeNE) tem como meta a produção de bibliotecas de seqüências de DNA geradas artificialmente por transcrição reversa do DNA (cDNA) da *L. chagasi*, submetidas a diferentes tratamentos, e do posterior seqüenciamento de 150.000 seqüências curtas de cDNA (EST).

O seqüenciamento do transcriptoma da *L. chagasi* está em andamento e já possui uma grande quantidade de dados, o que resulta na necessidade de desenvolvimento de tecnologias adequadas para o armazenamento, organização e disponibilização em banco de dados, facilitando o manuseio destes dados por biólogos computacionais para a interpretação do significado desse material (Fig.

9). Estes pontos constituem os objetivos centrais da bioinformática, área de conhecimento multidisciplinar voltada essencialmente para a aplicação da tecnologia da informação às ciências biológicas e biomédicas (Claverie, 2000).

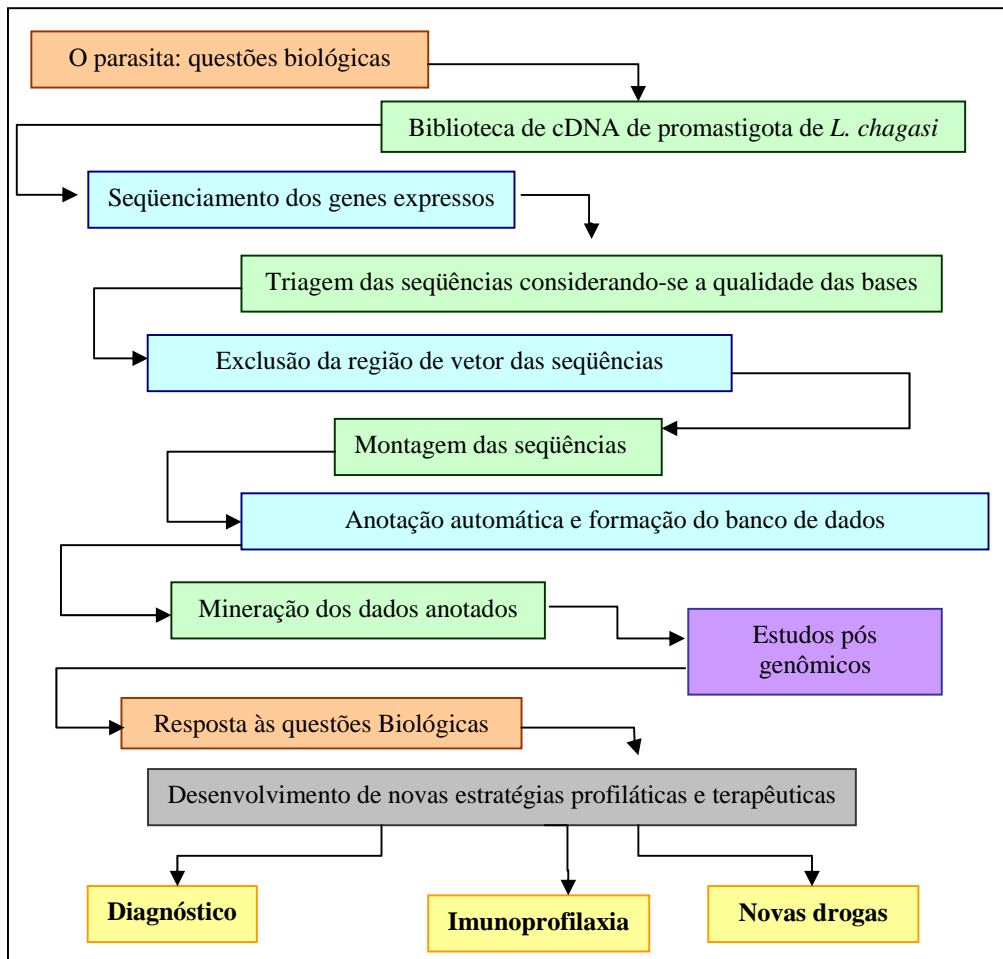


Figura 9: Fluxograma para o desenvolvimento de estratégias de abordagens genômicas e pós-genômicas visando alcançar o diagnóstico, profilaxia e terapêutica da leishmaniose visceral.

2.16 - Bioinformática

A bioinformática é um novo e crescente ramo da ciência que tem como objetivo responder questões biológicas através do uso de análises com ferramentas computacionais. O potencial desta abordagem tem mudado a maneira de se fazer ciência básica e aplicada, auxiliando pesquisas realizadas em laboratório (Baxevanis, 2001). A descoberta de novos genes, bem como a

determinação de suas funções eram, até bem pouco tempo, baseadas em uma conjugação de técnicas genéticas, bioquímicas e de biologia molecular. Porém, com o advento da genômica, a identificação dos novos genes pôde ser realizada através de métodos automáticos, em menor escala de tempo e recursos financeiros (Cho e Walbot, 2001). A geração crescente destes dados implicou no desenvolvimento de tecnologias adequadas voltadas não só para a armazenagem, mas para a interpretação dos dados. E é por esta necessidade que surgiu a bioinformática, área multidisciplinar que aplica a tecnologia da informação às ciências biológicas (Sanson e Smith, 2000).

2.16.1- Anotação de genes

Até pouco tempo atrás, a descoberta de genes envolvia basicamente o uso de técnicas de biologia molecular e bioquímica combinadas. A compreensão da função dos genes requeria a identificação de fenótipos mutantes, a identificação da localização e o exame do padrão de expressão através de ensaios bioquímicos. Ainda que estas técnicas sejam atuais, novas ferramentas foram desenvolvidas, permitindo ao pesquisador uma análise em larga escala de seqüências genômicas através da comparação com outras seqüências depositadas em bancos de dados, públicos e privados (Parinov e Sundaresan, 2000; Walbot, 2000). A esta abordagem comparativa entre seqüências dá-se o nome de anotação ou mineração de dados (Cho e Walbot, 2001).

O processo de anotação de genes compreende várias fases como eliminação de seqüências vetoriais, identificação de ORF (*Open Reading Frames*, ou segmentos de leitura aberta) e alinhamento de seqüências com outras depositadas em bancos de dados, através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990) (Fig. 10). Se houver similaridade com outras seqüências, o programa fornece informações a respeito de domínios conservados, posição taxonômica relativa dos organismos, além do gráfico indicando a qualidade do alinhamento (Benson *et al.*, 2000).



Figura 10: Esquema representativo de todas as etapas pelas quais as seqüências são submetidas desde o término do sequenciamento até o alinhamento local de seqüências (BLAST).

A ferramenta BLAST[®] corresponde a uma família de programas desenvolvida com o objetivo de alinhar e comparar seqüências depositadas em bancos de dados. Este programa é subdividido em ferramentas de acordo com o tipo de seqüências de entrada (nucleotídeos ou aminoácidos) e com o tipo de resultado esperado. Os principais tipos de são:

BLASTn – compara seqüências de nucleotídeos com o banco de dados de nucleotídeos;

BLASTp - compara seqüências de aminoácidos com o banco de dados de proteínas;

BLASTx - compara seqüências de nucleotídeos com a base de dados de proteínas.

A fim de avaliar se um alinhamento é significativo ou se é apenas uma coincidência de alguns poucos pares de bases, que apresentaram alguma identidade entre as seqüências, é necessário confirmar a possibilidade daquela similaridade ter ocorrido ao acaso. Quanto mais elevado for o valor de *score* e mais próximo de zero o *e-value*, maior será a similaridade entre as seqüências.

A análise da pontuação conferida ao alinhamento deve considerar entre outros fatores, que em um pareamento correto, as duas seqüências tenham o mesmo comprimento, todas as suas bases similares e não apresentem *gaps*. Na

matriz de pontuação utilizada, atribui-se valor 2 à coincidência de uma base entre duas seqüências, valor -2 se elas são distintas e valor -5 se há necessidade da introdução de um *gap*, para permitir o alinhamento do restante das seqüências. Portanto, alinhamentos mais significativos terão o maior *score*. (Rashidi & Buehler, 2000).

Outro importante parâmetro de análise do alinhamento é o *e-value* ou equação associada ao valor do *score*, que mede a possibilidade do evento de alinhamento ocorrer ao acaso. O melhor alinhamento possível é alcançado com *e-value* igual a zero. Valores de *e-value* menores que e^{-10} podem ser considerados significativos para alinhamento de seqüências de aminoácidos e valores menores que e^{-20} para alinhamentos de seqüências de nucleotídeos (Karlin e Altschul (1990; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/tutorial>).

2.16. 2- Alinhamento múltiplo de seqüências

É uma ferramenta importante e essencial para a pesquisa em bioinformática. Esse tipo de alinhamento é caracterizado pela comparação global de três ou mais seqüências (DNA, proteína ou RNA) homólogas ou similares (Bottomley, 2000).

Esses alinhamentos são importantes porque extraem informações significativas de um bloco de dados de seqüências primárias, exibindo na forma de um breve sumário, inferindo filogeneticamente a relação entre as seqüências similares (por exemplo, a existência de uma família gênica ou protéica). Eles também ajudam a encontrar regiões de similaridade entre seqüências de proteínas que não estão próximas na escala evolutiva.

Os programas de alinhamento múltiplos têm como base alguns conceitos fundamentais como a existência de famílias de seqüências que dividem algumas características comuns (estrutura e função ou os dois), e isso é refletido pela presença de regiões conservadas em um alinhamento múltiplo dessas seqüências; quanto maior a quantidade de seqüências homólogas em um alinhamento, maior a possibilidade da variação que existe numa família inteira de proteínas relacionadas ser representada pela variação observada entre as

seqüências. O alinhamento de uma família de seqüência de proteínas produz mais informações do que o alinhamento de uma par de seqüências. Isto é, quando três ou mais seqüências são alinhadas, há informações nas combinações de seqüências que não estão presentes em nenhuma das seqüências ou par de seqüências.

Um dos mais utilizados programas de alinhamento múltiplo é o ClustalX (Thompson *et al.*, 1997), que é uma interface do programa ClustalW. O primeiro possui uma interface gráfica compatível com Windows (PC) e com Macintosh (Mc) e o segundo é uma versão *on-line* disponibilizada nos principais bancos de dados. Ele fornece um ambiente integrado para efetuar alinhamento múltiplo de seqüências, permitindo a visualização do perfil dos alinhamentos e analisando os resultados.

No que se refere à busca de motivos e padrões conservados em famílias protéicas, observa-se que, algumas regiões têm sido mais bem conservadas do que outras durante a evolução. Estas regiões são importantes devido à sua função. Analisando as propriedades constantes e variáveis dos grupos de seqüências similares, é possível determinar uma assinatura para uma família protéica ou domínio, que distingue seus membros de todas as outras proteínas não relacionadas. Com isso, uma assinatura protéica pode ser usada para determinar uma nova proteína seqüenciada, enquadrando-a em uma família específica de proteínas e conseqüentemente formular hipóteses sobre sua função.

Entre os bancos secundários que buscam informações acerca de funções protéicas está o INTERPRO (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) que é um banco de proteínas construído a partir da reunião de algumas ferramentas de busca de famílias e domínios protéicos, como o Pfam ou o PROSITE, e alguns dos principais bancos de informações de proteína como o Swiss-Prot e o TREMBL. Estes programas baseiam-se na observação de que, enquanto existe um grande número de diferentes proteínas, a maior parte pode ser agrupada, com relação à similaridade de suas seqüências, dentro de um número limitado de famílias. Proteínas ou domínios de proteínas pertencentes a um grupo particular de uma

mesma família geralmente desempenham funções similares e são derivados de uma ancestral comum (Falquet *et al.*, 2002).

Atualmente o PROSITE contém assinaturas específicas para cerca de mil famílias protéicas ou domínios. Cada assinatura vem com uma documentação fornecendo informações sobre a estrutura e a função destas proteínas. E após a anotação das prováveis funções dos genes é possível se caracterizar todos os produtos gênicos encontrados em um projeto de sequenciamento. Essa categorização é realizada através da comparação das seqüências anotadas com bancos públicos de genes ortólogos que oferecem ferramentas para caracterização de novas moléculas (Kreuzer e Masey, 2002; Prosdocime *et al.*, 2002).

3 - Referências

- ABBAS, K.A.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Cellular and Molecular Immunology, **W.B. Saunders**, Philadelphia, 2000.
- ADHUNA; SALOTRA,P.; MUKHOPADHYAY, B.; BHATNAGAR, R. Modulation of macrophage heat shock proteins (HSPs) expression in response to intracellular infection by virulent and avirulent strains of *Leishmania donovani*. **Biochemical Molecular Biology International**, v. 43, p. 1265-1275, 1997.
- AGUILAR, C.M.; FERNANDEZ, E.; FERNANDEZ, R., CANNOVA, D.C.; FERRER, E.; CABRERA, Z.; SOUZA, W.J.; COUTINHO, S.G. Urban visceral leishmaniasis in Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 93,p.15-16, 1998.
- AKHTER, M. Control of Leishmaniasis. Disponível em <http://homepages.uel.ac.uk/D.P.Humber.akhter>, 1998.
- ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula** 3ª Edição, Editora Artes Médicas, 1997.
- ALENCAR, J.E. Leishmaniose visceral (calazar). In: VERONESI. **Doenças infecciosas e parasitárias**, 8ª. Edição, Editora Guanabara Koogan, p.706-717, 1991.
- ALONSO, G, GUEVARA, P., RAMIREZ, JL. Trypanosomatidae codon usage and GC distribution. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.87, p. 517-23, 1992.
- ALTSCHUL, S.F.; [GISH, W.](#); [MILLER, W.](#); [MYERS, E.W.](#); [LIPMAN, D.J.](#) Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ANDERSEN, K.A.; BRITIGAN, B.E.; WILSON, M.E. Short report: regulation of inducible heat shock protein 70 genes in *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 54, p. 471-474, 1996.
- ANDRADE, C.R.; ANDRADE, P.P.; WRIGHT, E.P. Use of recombinant HSP-like polypeptides in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 92, 1990.

- ANDRADE, C.R.; KIRCHHOFF, L.V.; DONELSON, J.E.; OTSU, K. Recombinant *Leishmania* HSP90 and HSP70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not Chagas'disease patients. **Journal Clinical Microbiology**, v. 30, p. 330-335,1992.
- ANDRADE, P.P.; ANDRADE, C.R. Heat shock proteins in visceral leishmaniasis. In **Stress Proteins in Medicine**, Marcel Dekker Publish. Co., p. 308-326, 1996.
- ANDRADE, C.R. Resposta imune anti - proteínas de choque térmico na leishmaniose visceral. **Tese de Doutorado em Medicina Tropical**, UFPE, 1997.
- ANGEL, S.O.; REQUENA, J.M.; SOTO, M.; CRIADO, D.; ALONSO, C. During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. **Acta Tropica**, vol. 62, p. 45-56, 1996.
- ANTOINE, J.C.; PRINA, E.; LANG, T.; COURRET, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbor *Leishmania* in murine macrophages. **Trends in Microbiology**, v. 7, p. 392-401,1998.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal of Parasitology**, v. 30, p.1269-1281, 2001.
- BADARÓ, R.; JONES, T.C.; CARVALHO, E.M.; SAMPAIO, D., RED, S.G., BARRAL, A., TEIXEIRA, R., JOHNSON, W.D. JR. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **Journal of Infection Disease**, v. 154, p. 1003-1011, 1986.
- BANCO DE DADOS DE CODONS USUAIS. Disponível em:
<http://www.kazusa.or.jp>
- BARD, E. Molecular biology of *Leishmania*. **Biochemical Cell Biology**, v. 67, p. 516-524, 1989.

- BASTIEN, P.; BLAINEAU, C.; BITTO, C.; EDDET, J.P., DUBESSAY, P.; PAGÈS, M.; RAVEL, C.; WINKER, P.; IVENS, A.; LEWIS, S.; BAGHERZADEH, A.; SMITH, D.; MYLER, P.; SUART, K.; CRUZ, A.; RUIZ, J.C.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; ALMEIDA, R.; PAPADOPOULOU, B.; SHAPIRA, M.; BELLI, S.; FASEL, N. The complete Chromosomal Organization of the Reference Strain of the *Leishmania* Genome Project, *L. major* 'Friedlin'. **Parasitology Today**, v. 14, p. 301-303, 1998.
- BASTIEN, P.; BLAINEAU, C.; PAGÈS, M. Molecular karyotype analysis in *Leishmania*. In: Subcellular biochemistry (ed.J.L. avila and J.R.Harris), vol. 18, p.131-187. **Plenum Press**, 1992.
- BAXEVANIS, A.D. Bioinformatics and the Internet. **Methods Biochemical Analysis**, v. 43, p. 1-17, 2001.
- BENSON, D.A.; KARSH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, I.; RAPP, B.A.; WHEELER, D.L. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 15-18, 2000.
- BENTE, M.; HARDER, S.; WIESGIGL, M.; HEUKESHOVEN, J.; GELHAUS, C.; KRAUSE, E.; CLOS, J; BRUCHHAUS, I. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. **Proteomics**, v. 3, p. 1811-1829, 2003.
- BIANCO, A.E. A repetitive antigen of *Plasmodium falciparum* that is homologous to heat shock 70 of *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Science U.S.A**, v. 83, p. 8713-8717, 1986.
- BLACKWELL, J.M. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. **Parasitology**, v. 112, S67-S74, 1996.
- BOGDAN, C.; ROELLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal of Parasitology**, v. 28, p. 121-134, 1998.
- BONNEFOY, S.; ATTAL, G.; LANGSLEY, G.; TEKAIA, F.; MERCEREAU-PUIJALON, O. Molecular characterization of the heat shock protein 90 gene of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Molecular of Biochemical Parasitology**, v. 67, p. 157-170, 1994.

- BOTTOMLEY, S. Bioinformatics: multiple alignment, an essential bioinformatic tool. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 262-264, 2000.
- BRANDAU, S.; DRESEL, A.; CLOS, J. High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus *Leishmania*. **Biochemical Journal**, v. 310, p. 225-232, 1995.
- BRITTO, C.; RAVEL, C.; BASTIEN, P.; BLAINEAU, C.; PAGES, M.; DEDET, J.P.; WINCKER, P. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. **Gene**, v.222, p. 07-17, 1998.
- BUATES, S.; MATLASHEWSKI, G. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators Imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. **Journal of Infection Disease**, v. 179, p. 1485 -1494,1999.
- BUCHNER, J. Hsp90 & Co. - a holding for folding. **Trends of Biochemical Science**, v. 24, 136-141, 1999.
- CHANG, K.P.; REED, S.G.; MCGWIRE, B.S., SOONG, L. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. **Acta Tropica**, v. 85, p. 375-390, 2003.
- CHO, Y.; WALBOT, V. Computacional methods for gene annotation: the Arabdopsis genome. **Current Opinion Biotechnology**, v. 12, p. 126-130, 2001.
- CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. Leishmaniose Visceral Americana (Calazar Americano ou Neotropical). In: **Parasitologia Humana e seus fundamentos gerais**. Segunda Edição, Editora Atheneu, p. 65-80, 2001.
- CLAVERIE, J.M. From bioinformatics to computational biology. **Genome Research**, v. 10, p. 1277-1279, 2000.
- CLAYTON, D.; MCKEIGUE, P.M. Epidemiological methods for studying genes and environmental factors in complex diseases. **Lancet**. v.20, p. 1356-60, 2001.

- COELHO, E.A.; TAVARES, C.A.; CARVALHO, F.A.; CHAVES, K.F.; TEIXEIRA, K.N.; RODRIGUES, R.C.; CHAREST, H.; MATLASHEWSKI; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Infection Immunity**, v. 71, p. 3988-3994, 2003.
- COLER, R.N.; SKEIKY, Y.A.; BERNARDS, K.; GREESON, K.; CARTER, D.; CORNELLISON, C.D.; MODABBER, F.; CAMPOS-NETO, A.; REED, S.G.; Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-Cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania major* stress-inducible protein 1, and *Leishmania* elongation initiation factor protects against leishmaniasis. **Infection Immunity**, v. 70, p. 4215-4225, 2002.
- COQUEIRO, E. Polipeptídeo recombinante vacuolar de 29kDa para diagnóstico da doença de Chagas. **Tese de Mestrado em Genética**, UPFE, 1996.
- CORONATO, S. **Biología de las proteínas del shock térmico**, v. 59, p. 477-486, 1999.
- COSTA, S.R.; D'OLIVEIRA, A. JR.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M.; T cell response of asymptomatic *Leishmania chagasi* infected subjects to recombinant *Leishmania* antigens. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 367-70, 1999.
- COX, F.E.G. Designer vaccines for parasitic diseases. **International Journal of Parasitology**, v. 27, p. 1147-1157, 1997.
- DE ALMEIDA, M.C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL - NETO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p.861-670, 2003.
- DIAS, F. O.; LOROSA, E.S; REBELO J.M. [Blood feeding sources and peridomiciliation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (*Psychodidae*, *Phlebotominae*)] **Caderno de Saude Publica**, v. 19, p. 1373-1380, 2003.

- DRAGON EA, SIAS SR, KATO EA, GABE JD. The genome of *Trypanosoma cruzi* contains a constitutively expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein. **Molecular of Cell Biology**, v. 7, p. 1271-1275, 1987.
- DUJARDIN, J.C.; VICTOR, K.; DE DONKER, S.; GUERBOUJ, S.; AREVALO, J.; LE RAY, D. Molecular epidemiology and diagnosis of *Leishmania*: what have we learnt from genome structure, dynamics and function? **Transactions Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, v.96 Suppl 1, p.81-86, 2002.
- DUJON, B. The yeast genome project: What did we learn? **Trends Genetics**, v. 12, p. 263-270, 1996.
- DURET, L.; MOUCHIROUD, D. Expression pattern and, surprisingly, gene length shape codon usage in *Caenorhabditis*, *Drosophila*, and *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Science U S A**, v. 96, p. 4482-4487, 1999.
- ECHEVERRIA, P.; DRAN, G.; PEREDA, G.; RICO, A.I.; REQUENA, J.M.; ALONSP, C.; Guarnera, E.; Angel, S.O. Analysis of the adjuvant effect of recombinant *Leishmania infantum* Hsp83 protein as a tool for vaccination. **Immunology Letters** v. 76, p. 107-110, 2001.
- EDEN, W.V. ;YOUNG, D.B. Stress Proteins in Medicine. **Marcel Dekker, Inc.** N.Y., p. 1-26, 1996.
- EPHROS, M.; BITNUN, A.; SHAKED, P.; WALDMAN, E.; ZILBRESTEIN, D. Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 43, p. 278-282, 1999.
- EFFRON, P.N.; TORRI, A. F.; ENGMAN, D.M.; DONELSON, J.E.; KIRCHHOFF, L.V. *Trypanosoma cruzi* exhibits inter-and-intra –strain heterogeneity in molecular karyotype and chromosomal gene location. **Molecular of Biochemical Parasitology**, v. 59, p. 191-200,1993.
- ENGERS, H.D.; BERGQUIST, R.; MODABBER, F. Progress on Vaccines Against Parasites. **Developments of Biological Standardization**, v. 87; p. 73-84, 1996.

- ENGMAN, D.M.; KIRCHHOFF, L.V.; DONELSON, J.E. Molecular cloning of mtp 70, a mitochondrial member of the hsp70 family. **Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 5163-5168, 1989.
- ENGMAN, D.M.; FEHR, S.C.; DONELSON, J.E. Specific functional domains of mitochondrial hsp70s suggested by sequence comparison of the trypanosome and yeast proteins. **Molecular Biochemical Parasitology**, v.51, p.153-155, 1992.
- FALQUET, L.; [PAGNI, M.](#); [BUCHER, P.](#); [HULO, N.](#); [SIGRIST, C.J.](#); [HOFMAN, K.](#); [BAIROCH, A.](#) The PROSITE database, its status in 2002. **Nucleic Acids Research**, v. 1, p. 235-238, 2002.
- FEDER, M.E.; HOFMANN, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 243-282, 1999.
- FICHOUX, Y.L.; ROUSSEL, L.D.; FERRUA, B.; RUETTE, S.; LELIEVRE, A.; GROUSSON, D, KUBAR, J. Short – and long - term efficacy of hexadecyl – phosphocoline against established *Leishmania infantum* infection in BALB/c mice. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 42, p. 654-658, 1998.
- FOLLADOR, I; ARAÚJO, C.; ORGE, G.; CHENG, L.H.; CARVALHO, L.; BACELLAR, O.; ALMEIDA, R.P., CARVALHO, E.M. Immune response to an inactive vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage- colony - stimulating factor. **Vaccine**, v. 20, p. 1365-1368, 2002.
- FRANCA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A.M.; MACHADO-COELHO, G.L.; DA COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E.P.; COSTA, J.S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic área of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 111, p. 161-173, 2003.
- FRAKENBURG, S.; AXELFOLD, O. ; KUTNER, S.; GREENVLATT, C.L.; KLAUS, S.N.; PIRAK, E.A.; MCMASTER, R.; LOEWELL, G.H. Effective immunization of mice against cutaneous leishmaniasis using an intrinsically adjuvanted synthetic lipopeptide vaccine. **Vaccine**, v. 14, p. 932-929, 1996.

FROMMEL, D.; OGUNKOLADE, B.W.; VOULDOUKIS; MONJOUR, L. Vaccine-induced immunity against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Infection Immunity**, v. 56, p. 843-848, 1988.

[FU, G.; BARKER, D.C.](#) Characterisation of *Leishmania* telomeres reveals unusual telomeric repeats and conserved telomere-associated sequence. **Nucleic Acids Research**, v. 26, p. 2161-2167, 1998.

FU, G.; MELVILLE, S.E. Polymorphism in the subtelomeric regions of chromosomes of Kinetoplastida. **Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v. 96, p. 31-40, 2002.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). Disponível em: http://www.funasa.gov.br/pub/boletim_eletronico_epi/boletim_eletronico_epi_0602.pdf.

FUGLSANG, A. The effective number of codons for individual amino acids: some codons are more optimal than others. **Gene**, v. 27, p.185-190, 2003.

GAMA, M.E.; COSTA, J.M.; PEREIRA, J.C.; GOMES, C.M. CORBETT, C.E. Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v. 37, p.129-136, 2004.

GARLAPATI, S.; DAHAN, E.; SHAPIRA, M. Effect of acidic pH on heat shock gene expression in *Leishmania*. **Molecular of Biochemical Parasitology**, v. 100, p. 95-101, 1999.

GOMES, N.A.; BARRETO-DE-SOUZA, V.; WILSON, M.E.; DOS REIS, G.A. Unresponsive CD4⁺ T lymphocytes from *Leishmania chagasi*-infected mice increase cytokine production and mediate parasite killing after blockade of B7-1/CTLA-4 molecular pathway. **Journal of Infection Disease**, v. 178, p. 1847-1851, 1998.

GRADONI, L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for canine *Leishmania* vaccine. **Veterinary Parasitology**, v. 100, p. 87-103, 2001.

GRAEFE, D.E.; WIESGIGL, M.; GAWORSKI, I.; MACDONALD, A.; CLOS, J. Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* induces a stress response but no stage differentiation. **Eukaryotic Cell**, v. 1, p. 936-943, 2002.

- GRIMALDI, G.J.R.; TESH, R.B.; MCMAHON-PRATT, A. A review of geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 4, p. 687-725, 1989.
- GUERIN, P.J.; [OLLIARO, P.](#); [SUNDAR, S.](#); [BOELAERT, M.](#); [CROFT, S.L.](#); [DESJEUX, P.](#); [WAASUNNA, M.K.](#); [BRYCESON, A.D.](#) Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infectious Disease**, v. 2, p. 494-501, 2002.
- GUNTHER, E. Heat shock protein genes and the major histocompatibility complex. **Current Topics of Microbiology Immunology**, v. 167, p. 57-68, 1991.
- GUPTA, A .K.; NARAYAN, S.; SHARMA, M.C.; SARAN, R.; KAR, S.K. Effects of elevated temperature and lower pH on infectivity of *Leishmania donovani* promastigotes. **Journal of Communication Disease**. v. 31, p. 257-259, 1999.
- GUPTA, S.K.; MAJUMBAR, S.; BHATTACHARYA, T.K.; GHOSH, T.C. Studies on the relationships between the synonymous codon usage and protein secondary structural units. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v.269, p.692-696, 2000.
- HAAS, I.G. BiP- a heat shock protein involved in immunoglobulin chain assembly. **Current Topics of Microbiology and Immunology**, v. 167, p. 71-82, 1991.
- HANDMAN, E.; NOORMOHAMMADI, A.H.; CURTIS, J.M.; BALDWIN, T.; SJOLANDER, A. Therapy of murine cutaneous leishmaniasis by DNA vaccination. **Vaccine**, v. 18, p. 3011-3017, 2000.
- HEDSTROM, R.; CULPEPPER, J.; HARRISON, R.A.; AGABIAN, N.; NEWPORT, G. A major immunogen in *Schistosoma mansoni* infections is homologous to the heat shock protein HSP70. **Journal of Experimental Medicine**, v. 165, p. 1430-1435, 1997.
- HELMBRECHT, K.; ZEISE, E.; RENSING, L. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. **Cell Proliferation**, v. 33, p. 341-365, 2000.
- HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, p. 1191-1199, 1999.

- HOFMAN, V.; BROUSSET, P.; MOUGNEAU, E.; MARTY, P.; LAMANT, L.; ANTOINE, J.C.; GLAICHENHAUS, N.; HOFMAN, P. Immunostaining of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* using monoclonal antibody (19-11) to the *Leishmania* homologue of receptors for activated C-kinase. **American Journal Clinical Pathology**, v. 120, p. 567-574, 2003.
- HUBEL, A.; CLOS, J. The genomic organization of the HSP83 gene locus is conserved in three *Leishmania* species. **Experimental Parasitology**, v. 82, p. 225-228, 1996.
- IVENS, A. C; BLACKWELL, J.M. The *Leishmania* genome comes of Age. **Parasitology Today**, v.15, p. 225-31, 1999.
- IVENS, A.C.; SMITH, D.F. A global map of the *Leishmania major* genome: Prelude to genome sequencing. **Transactions Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, v. 91, p. 111-115, 1997.
- JENSEN, A.T.; GASIM, S.; MOLLER, T.; ISMAIL, A.; GAAFAR, A.; KEMP, M.; EL HASSAN, A.M.; KHARAZMI, A.; ALCE, T.M.; SMITH, D.F.; THEANDER, T.G. Serodiagnosis of *Leishmania donovani* infections: assessment of enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant *L. donovani* gene B protein (GBP) and a peptide sequence of *L. donovani* GBP. **Transactions Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, v. 93, p. 157-160, 1999.
- JERONIMO, S.M.; OLIVEIRA, R.M.; MACKAY, S.; COSTA, R.M.; SWEET, J.; NASCIMENTO, E.T.; LUZ, K.G.; FERNANDES, M.Z.; JERNIGAN, J.; PEARSON, RD. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. **Transactions Royal Society of Tropical Medicine**, v. 88, p. 386-388. 1994.
- KARLIN, S.; ALTSCHUL, S.F. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. **Proceedings of National Academy of Science U S A**. v.(6), p.2264-2268, 1990.
- KAUFMANN, S.H.E. Heat shock proteins and the immune response. **Immunology Today**, v. 11, p. 129-136, 1990.
- KELLEY, W.L. The J-domain family and the recruitment of chaperone power. **Trends in Biochemical Science**, v. 23, p. 222-227, 1998.

- KILLICK-KENDRICK, R. The life cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annual Parasitology Human Comparative**, v. 65, p. 37-42, 1990.
- KRAUTZ, G.M.; PETERSON, J.D.; GODSEL, L.M.; KRETTLI, A.U.; ENGMAN, DM. Human antibody responses to *Trypanosoma cruzi* 70-kD heat-shock proteins. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v.58, p.137-43, 1998.
- KREUZER, H.; MASSEY, A. **Engenharia genética e biotecnologia** 2ª ed. Artmed, Porto alegre, 2002.
- LEE, J.Y.; ATOCHINA, O.; KING, B.; TAYLOR, L.; ELLOSO, M.; SCOTT, P.; ROSSMAN, M.D. Beryllium, an adjuvant that promotes gamma interferon production. **Infection Immunity**, v. 68, p. 4032-4039, 2000.
- LEBOWITZ, J.H.; SMITH, H.Q.; RUSHCHE, L., BEVERLEY, S.M. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. **Genes Development**. v. 7, p. 996-1007, 1993.
- LOUZIR, H.; TEBOURSKI, F.; SMITH, D.F.; ISMAIL, R.B.; DELLAGI, K. Antibodies to *Leishmania donovani infantum* heat-shock protein 70 in human visceral leishmaniasis. **Journal of Infection Disease**, v. 169, p. 1183-1184, 1994.
- LYRA, J.M.A. Utilização de ferramentas computacionais na análise comparativa do gene HSP70 da *Leishmania chagasi* e *Leishmania infantum*. **Monografia em Ciências Biológicas**, UFPE, 2003.
- MACFARLANE, J.; [BLAXTER, M.L.](#); [BISHOP, R.P.](#); [MILES, M.A.](#); [KELLY, J.M.](#) Identification and characterisation of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat-shock protein family. **European Journal of Biochemical**, v. 190, p. 377-384, 1990.
- McHUGH, C.P.; MELBY, P.C.; LAFON, S.G. Leishmaniasis in Texas: epidemiology and clinical aspects of human diseases. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**. v.55, p.547-55, 1996.

- MAHBOUDI, F.; ABOLHASSAN, M.; YARAN, M.; MOBTAKER, H.; AZIZI, M. Identification and differentiation of Iranian *Leishmania* species by PCR amplification of kDNA. **Scandinavian Journal of Infection Disease**, v. 8, p. 596-598, 2001.
- MARESCA, B.; KOBAYASHI, G.S. Hsp70 in parasites as an inducible protective protein and as an antigen. **Experientia**, v. 50, p. 1067-1074, 1994.
- MARTINEZ, E.; LE PONT, F.; TORREZ, M.; TELLERIA, J.; VARGAS, F.; MUNOZ, M.; DE DONCKER, S.; DUJARDIN, J.C.; DUJARDIN, J.P. A new focus of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania amazonensis* in a Sub Andean region of Bolivia. **Acta Tropica**, v. 71, p. 97-106, 1998.
- MARTINEZ-SUBIELA, S.; BERNAL, L.J.; CERON, J.J. Serum concentrations of acute-phase proteins in dogs with leishmaniosis during short-term treatment. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, p. 1021-1026, 2003.
- MARTY, P.; ROSENTHAL, E. Treatment of visceral leishmaniasis: a review of current treatment practices. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, v. 3, p. 1101-1108, 2002.
- MARZOCHI, K.B.F.; MARZOCHI, M.C.A.; SCHUBACH, A.O. Leishmaniose visceral: Interação hospedeiro-parasito e determinismos das formas clínicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, p.59, 1999.
- MATTEWS, R.; BURNIE, J. Acquired immunity to systemic candidiasis in immunodeficient mice: role of antibody to heat-shock protein 90. **Journal of Infection Disease**, v. 166, p. 1193-1195, 1992.
- MAUEL, J. Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. **Advance in Parasitology**, v. 38, p. 1-51, 1996.
- MAURICIO, I.L.; GAUNT, M.W.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. **Parasitology**, v.122, p.393-403, 2001.

- MAYRINK, W.; WILLIAMS, P.; COELHO, M.V.; DIAS, M.; MARTINS, A.V.; MAGALHÃES, P.A.; DA COSTA, C.A.; FALCÃO, A.R.; MELO, M.N.; FALCÃO, A.L. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. **Annual Tropical Medicine of Parasitology**, v. 73, p. 123-137, 1979.
- McKEAN, P.G.; DENNY, P.W.; KNUEPFER, E.; KEEN, J.K.; SMITH, D.F. Phenotypic changes associated with deletion and overexpression of a stage-regulated gene family in *Leishmania*. **Cell Microbiology**, v. 3, p. 511-523, 2001.
- MINODIER, P.; ROBERT, S.; RETORNAZ, K.; GARNIER, J.M. [Visceral leishmaniasis: new drugs] **Archives of Pediatrics**.v. 5, p.550-556, 2003.
- MINOWADA, G. ; WELCH, W. Variation in the expression and/or phosphorylation of the human low molecular weight stress protein during in vitro cell differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 7047-7054, 1995.
- MKUNZA, F.; OLAHO, W.M.; POWELL, C.N. Partial protection against natural trypanosomiasis after vaccination with a flagellar pocket antigen from *Trypanosoma brucei rhodesiense*. **Vaccine**, v. 13, p. 151-154, 1995.
- MOSSALAYI, M.D.; AROCK, M.; MAZIER, D.; VINCENDEAU, P.; VOULDOUKIS, I. The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. **Parasitology Today**, v.15, p. 342-345, 1999.
- MOMEM, H. *Leishmania infantum*, the ethiological agent of the American visceral leishmaniasis (AVL). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 447-448, 1987.
- MONJOUR, L.; NEOGY, A.B.; VOULDOUKIS, I.; SILVA, O.A.; BOISNIC, S.; BRITO, M.E.; LESOT, A.; VIGNOT, N.; MARTINS, J.S.; JARDIM, M.L. Exploitation of parasite derived antigen in therapeutic success of human cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 479-483, 1994.

MONTENEGRO, M.M.A. O transcriptoma de *Leishmania chagasi*: lições das primeiras 10.000 sequências. **Tese de Mestrado**, UFPE, 2003.

MORIYAMA, E.N.; POWELL, J.R. Gene length *and codon usage bias in Drosophila melanogaster, Saccharomyces cerevisiae and Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research** v.26, p. 3188-3193, 1998.

MOTTRAM, J.C.; MURPHY, W.J.; AGABIAN, N. A transcriptional analysis of the *Trypanosoma brucei* hsp83 gene cluster. **Molecular and Biochemistry Parasitology**, v.37, p. 115-127, 1989.

MOURA, P.M.M.F. Proteínas recombinantes de *Leishmania* no diagnóstico do calazar canino. **Tese de Mestrado em Microbiologia**, UFRJ, 1994.

MYUNG, K.S.; BEETHAM, J.K.; WILSON, M.E.; DONELSON, J.E. Comparison of the post-transcriptional for the surface proteins PSA (GP46) and MSP (GP63) of *Leishmania chagasi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 16489-16497, 2002.

NASCIMENTO, M.G.M.V Caracterização molecular de dois genes que codificam HSP70 mitocondrial de *Leishmania (L) chagasi* .**Tese de Mestrado em Genética**, UFPE, 2001.

NENE, V.; Dunne, D.W.; Johnson, K.S.; Taylon, D.W.; Cordingley, J.S. Sequence and expression of a major egg antigen from *Schistosoma mansoni*. Homologies to heat shock proteins and alpha-crystallins. **Molecular of Biochemical Parasitology**, v. 21, p. 179-186, 1986.

NEVES, P.N.; MELO, A.I.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. Parasitologia Humana – 10ª Edição **Ed. Atheneu**, 1998.

NEWPORT, G.R. Heat shock proteins as vaccine candidates. **Seminars in Immunology**, v.3, p.17-24, 1991.

NOZAIS, J.P. The origin and dispersion of human parasitic diseases in the old world (Africa, Europe and Madagascar). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v 98, p. 13-19, 2003.

OLIVEIRA, G.M. Aplicabilidade de uma fração carboxiterminal da proteína HSP70 para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Tese de Mestrado em Bioquímica**, UFPE, 2001.

- ORESIC, M.; SHALLOWAY, D. Specific correlations between relative synonymous codon usage and protein secondary structure. **Journal of Molecular Biology**. v.281, p. 31-48, 1998.
- PAGÉS, M.; BASTIEN, P.; VEAS, F.; ROSSI, M.; BELLIS, P.; WINCKER, J.A. RIOUX, P.; ROIZES, G. Chromosome size and number polymorphism in *Leishmania infantum* suggest amplification/deletion and possible genetic exchange. **Molecular of Biochemical Parasitology**, v. 36, p. 161-168, 1989.
- PARINOV, S; SUNDARESAN, V. Functional genomics in *Arabidopsis*: large-scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project. **Current Opinion Biotechnology**, v. 11, p.157-161, 2000.
- PARSONS, M.; STUART, K.; SMILEY, B.L. *Trypanosoma brucei*: analysis of codon usage and nucleotide composition of nuclear genes. **Experimental Parasitology**. v.73, p.101-105, 1991.
- PATZ, J.A.; GRACZYK, T.K.; GELLER, N.; VITTOR, A.Y. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **International Journal of Parasitology**, v. 30, p.1395-405, 2000.
- PIERCE, S.K. Molecular chaperones in the processing and presentation of antigen to helper T cells. **Experientia**. v.50, p.1026-1030, 1994.
- POLLA, B.S. Heat shock proteins in host parasite interaction. **Immunology Today**, v.12, A38 –A41, 1991.
- PROJETO GENOMA NORDESTE – ProgeNe – Disponível em : <http://www.progene.ufpe.br>
- PROSDOCIME, F.; CERQUEIRA, G.C.; BINNECK, E.; SILVA, A.F.; DOS REIS, N.A.; JUNQUEIRA, A.C.M.; DOS SANTOS, A.C.F.; NHANI, J.R.A.; WUST, C.I.; CAMARGO FILHO, F.; KESSEDJIAN, J.L.; PETRERSKI, J.H.; CAMARGO, L.P.; FERREIRA, R.G.M.; LIMA, R.P.; PEREIRA, R.M.; JARDIM, S.; SAMPAIO, V.S.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A.V. Bioinformática: Manual do Usuário. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.29, p.12-25, 2002.
- QUEIROZ, A.F.S. Avaliação do potencial vacinal da HSP70 de *Leishmania chagasi* em cães. **Tese de Mestrado em Biofísica**, UFPE, 2001.

- QUEIROZ, R.A. Identificação e caracterização *in silico* do gene da HSP70 de *Leishmania chagasi*, utilizando o banco de dados do Programa Genoma Nordeste. **Monografia em Ciências Biomédicas**, UFPE, 2003.
- QUIJADA, L.; REQUENA, J.M.; SOTO, M.; GOMEZ, L.C.; GUZMAN, F; PATARROYO, M.E.; ALONSO, C. Mapping of the linear antigenic determinants of the *Leishmania infantum* hsp70 recognized by leishmaniasis sera. **Immunology Letters**, v.52, p.73-79, 1996.
- QUIJADA, L.; SOTO, M.; ALONSO, C.; REQUENA, J.M. Analysis of post-transcriptional regulation operating on transcription products of the tandemly linked *Leishmania infantum* HSP70 genes. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.4493 – 4499, 1997.
- QUIJADA, L.; SOTO, M.; ALONSO, C.; REQUENA, J.M. Identification of a putative regulatory element in the 3'-untranslated region that controls expression of HSP70 in *Leishmania infantum*. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 110, p.:79-91, 2000.
- RAFATI, S.; NAKHAE, A.; TAHERI, T.; GHASHGHAIL, A.; SALMANIAN, A.H.; JIMENEZ, M.; MOHEBALI, M.; MASINA, S.; FASEL, N. Expression of cysteine proteinase type I and II of *Leishmania infantum* and their recognition by sera during canine and human visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v.103, p.143-151, 2003.
- RASHIDI, H.H.; BAUER, M.; PATTERSON, J.; SMITH, D.W. Sequence motifs determine structure and Ca⁺⁺-binding by EF-hand proteins. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**.v.1, p.175-82, 1999.
- RAVEL, C.; WINCKER, P.; BASTIEN, P.; BLAINEAU, C.; PAGES, M. A polymorphic minisatellite sequence in the subtelomeric regions of chromosomes I and V in *Leishmania infantum*. **Molecular of Biochemical Parasitology**, v.74, p.31-41, 1995.
- REQUENA, JM, SOTO, M, QUIJADA, L, ALONSO, C. Genes and chromosomes of *Leishmania infantum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.92, p.853-858, 1997.

- REQUENA, J.M.; SOTO, M.; DORIA, M.D.; ALONSO, C. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.76, p.269-281, 2000.
- REY-LADINO, J. A.; JOSHI, P.B. ; SINGH, B.; GUPTA, R ; REINER, N.E. *Leishmania major*: molecular cloning, sequencing and expression of the Heat Shock Protein 60 gene reveals unique carboxy terminal peptide sequences. **Experimental Parasitology**, v.85: 249-263. 1997.
- RICO, A.I.; DEL REAL, G.; SOTO, M.; QUIJADA, L.; MARTINEZ, A. C.; ALONSO, C.; REQUENA, J.M. Characterization of the immunostimulatory properties of *Leishmania infantum* HSP70 by fusion to the *Escherichia coli* maltose-binding protein in normal and nu/nu BALB/c mice. **Infection Immunity**, v. 66, p.347-352, 1998.
- RICO, A.I.; ANGEL, S.O.; ALONSO, C.; REQUENA, J.M. Immunostimulatory properties of the *Leishmania infantum* heat shock proteins HSP70 and HSP83. **Molecular Immunology**, v.36, p.1131-113, 1999.
- RICO, A.I.; GIRONES, N.; FRESNO, M.; ALONSO, C.; REQUENA, J.M. The heat shock proteins, Hsp70 and Hsp83, of *Leishmania infantum* are mitogens for mouse B cells. **Cell Stress Chaperones**, v.7, p.339-346, 2002.
- ROBERTS,L.J.; HANDMAN,E.; FOOTE, S.J. Science, medicine and the future – Leishmaniasis. **British Medical Journal**, v.321, p.801-804, 2000.
- RODRIGUEZ, N.; DE LIMA, H.; RODRIGUEZ,A.; BREWSTER, S.; BARKER, D.C. Genomic DNA repeat from *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Venezuelan strain) containing simple repeats and microsatellites. **Parasitology**, v.115, p. 349-58, 1997.
- ROITT, I.; BROSTOFF,J.; MALE, D. Imunologia. **Ed. Manole**, 5a. Edição , São Paulo, 1999.
- ROJAS, P.A.; MARTIN, V.; NIGRO, M.; ECHEVERRIA, P.C.; GUARNERA, E.A.; PSZENNY, V.; ANGEL, S.O. Expression of cDNA encoding a *Toxoplasma gondii* protein belonging to the heat –shock 90 family and analysis of its antigenicity. **FEMS Microbiology Letters**, v.190, p. 209-213, 2000.

- ROSSI, V.; WINCKER, P.; RAVEL, C.; BLAINEAU, C.; PAGES, M.; BASTIEN, P. Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. *Molecular Biochemical Parasitology*, v.65, p.271-282, 1994.
- RUSSO, R.; NIGRO, L.; PANARELLO, G.; MONTINERI, A. Clinical survey of *Leishmania*/HIV co-infection in Catania, Italy: the impact of highly active antiretroviral therapy (HAART). **Annual Tropical of Medical Parasitology**, v.97, p.149-155, 2003.
- RUTHERFORD, S.L.; ZUKER, C.S. Protein folding and the regulation of signaling pathways. *Cell*, v.79, p.1129-1132, 1994.
- SALOTRA, P.; CHAUHAN, D.; RALHAN, R.; BHATNAGAR, R. Tumor Necrosis factor-alpha induces preferential expression of stress proteins in virulent promastigotes of *Leishmania donovani*. **Immunology Letters**, v.44, p.1-5, 1995.
- SÂMARAS, N.; SPITHILL, T.W. Molecular karyotype of five species of *Leishmania* and analysis of gene locations and chromosomal rearrangements. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 25, p. 279-291, 1987.
- SANSON, C.E.; SMITH, C.A. Computer applications in biomolecular sciences. Part 2: bioinformatics and genome projects. **Biochemical Education**, v.28, p. 127-131, 2000.
- SCHEIBEL, T.; WEIKL, T.; BUCHNER, J. Two chaperone sites in Hsp 90 differing in substrate specificity and ATP dependence. **Proceedings National of Academy of Science USA**, v.95, p.1495-1499, 1998.
- SCHLATTER, H.; LANGER, T.; ROSMUS, S.; ONNEKEN, M.L.; FASOLD, H. A novel function for the 90 kDa heat-shock protein (Hsp90): facilitating nuclear export of 60 S ribosomal subunits. **Biochemical Journal**, v.15, p.675-684, 2002.
- SCHOLLER, J.K.; REED, S.G.; STUART, K. Molecular karyotype of species and subspecies of *Leishmania*. **Molecular of Biochemical Parasitology**, v. 20, p.279-293, 1986.

- SEARLE, S.; CAMPOS, A.J.R.; COULSON, R.M.R.; SPITHILL, T.W.; SMITH, D.F. A family of heat shock protein 70-related genes are expressed in the promastigotes of *Leishmania major*. **Nucleic Acids Research**, v.17, p.5081-5095, 1989.
- SEARLE, S.; SMITH, D.F. *Leishmania major*. characterization and expression of a cytoplasmic stress-related protein. **Experimental Parasitology**, v.77, p. 43-52, 1993.
- SHAPIRA, M.; PINELLI, E. Heat-shock protein 83 of *Leishmania mexicana amazonensis* is an abundant cytoplasmic protein with a tandemly repeated genomic arrangement. **European Journal of Biochemical**, v. 6, p.231-236, 1989.
- SHERLOCK, I.A. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.79, p. 511, 1984.
- SILVA, E.C. Purificação e localização da proteína HSP70 de *Leishmania*. **Tese de Mestrado**, UFPE, 1995.
- SKEIKY, A.W.; GUDERIAN, J.A.; BENSON, D.R.; BACELAR, O.; CARVALHO, E.M.; KUBIN, M.; BADARÓ, R.; TRINCHIERI, G.; REED, S.G. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulatory human peripheral blood mononuclear cells to Express a Th-1 type cytokine profile and to produce interleukin 12. **Journal of Experimental Medicine**, v. 181, p. 1527-1537, 1995.
- SKEIKY, A.W.; BENSON, D.R.; GUDERIAN, J.A.; WHITTLE, J.A.; BACELAR, O.; CARVALHO, E.M.; REED, S.G. Immune response of leishmaniasis patients to heat shock proteins of *Leishmania* species and humans. **Infection Immunity**, v. 63, p. 4105- 4114, 1995.
- SKEIKY, A.W.; BENSON, D.R.; COSTA, J.L.M.; BADARÓ, R.; REED, S.G. Association of *Leishmania* heat shock protein 83 antigen and immunoglobulin G4 antibody titers in Brazilian patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. **Infection Immunity**, v.65, p.5368-5370, 1997.

- SMITH, T.K.; MILNE, F.C.; SHARMA, D.K.; CROSSMAN, A.; BRIMACOMBE, J.S.; FERGUSON, M.A.. Early steps in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis in *Leishmania major*. **Biochemical Journal**, v.326, p.393-400, 1997.
- SPITHILL, T.W.; SAMARAS, N. Genomic organization, chromosomal location and transcription of dispersed and repeated tubulin genes in *Leishmania major*. **Molecular of Biochemical Parasitology**, v. 24, p.23-37, 1987.
- SRIVASTAVA, P.K.; AMATO, R.J.. Heat shock proteins: the 'Swiss Army Knife' vaccines against cancers and infectious agents. **Vaccine**, v. 21, p.2590-2597, 2001.
- STEFANIAK, J.; PAUL, M.; KACPRZAK, E.; SKORYNA-KARCZ, B. [Visceral leishmaniasis] **Przegl Epidemiology** , v.57, p.341-348, 2003.
- STILES, J.K.; HICOCK, P.I.; SHAH, P.H.; MEADE, J.C. Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. **Annual Tropical Medicine of Parasitology** , v.93, p.781-807, 1999.
- SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias – Disponível em: www.sucen.sp.gov.br
- SULSTON, J.; DU, Z.; THOMAS, K.; WILSON, R.; HILIER, R.; STADEN, N.; HALLORAN, P.; GREEN, J.; THIERRY-MIEG, L.; QIU, S.; DEAR, A.; COULSON, M.; CRAXTON, R.; DURBIN, M.; BERKS, M.; METZTEIN, M.; HAWKINS, T.; AINSCOUGH, R.; WATERSTON, R. The *C.elegans* genome sequencing Project: A beginning. **Nature**, v. 356, p. 37-41, 1992.
- SUNKIN, S.M.; KISER, P.; MYLER, P.J.; STUART, K. The size difference between *leishmania major* friedlin chromosome one homologues is localized to sub-telomeric repeats at one chromosomal end. **Molecular of Biochemical Parasitology**, v. 109, p.1-15, 2000.
- [SUZUE, K.; YOUNG](#), R.A. Adjuvant-free hsp70 fusion protein system elicits humoral and cellular immune responses to HIV-1 p24. **Journal of Immunology**, v. 156, p. 873-876, 1996.
- TAMAR,S.; DUNAS,C.; PAPADOPOULOU,B. Chromosome structure and sequence organization between pathogenic and non-pathogenic *Leishmania* spp. **Molecular of Biochemical Parasitology**, v. 111, p.401-414, 2000.

TDR. Disponível em: www.who.int/tdr

TODRYK, S.M.; GOUGH, M.J.; POCKLEY, A.G. Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutic potential. **Immunology**, v.110, p.1-9, 2003.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**. v. 25, p.4876-82, 1997.

TSUJI, N.; [OHTAS, M.](#); [FUJISAKI, K.](#) Expression of a 70-kDa heat-shock-related protein during transformation from free-living infective larvae to the parasitic stage in *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology Research**, v.83, p.99-102, 1997.

URIBE, S. Current status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p.31-33, 2002.

VICTOIR, K.; DUJARDIN, J.C. How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*. **Trends in Parasitology**, v. 18, p.81-85, 2002.

WALBOT, V. *Arabidopsis thaliana* genome. A green chapter in the book of life. **Nature**, v.408, p.794-795, 2000.

WALLACE, G.R.; MACFARLANE, J.; BALL, A.E.; CLARKE, J.L.; MILES, M.A.; KELLY, J.M. Mapping of B-cell epitopes on the *Leishmania donovani* 70 kDa heat-shock protein. **Biochemical Society Transactions**, v.18, p.867, 1990.

WALLACE, G.R.; BALL, A.E.; MACFARLANE, J.; EL SAFI, S.H.; MILES, M.A.; KELLY, J.M. Mapping a visceral leishmaniasis-specific immunodominant B-cell epitope of *Leishmania donovani* HSP70. **Infection Immunity**, v.60, p. 2688-2693, 1992.

WATERSTON, R.; SULSTON, J. The genome of *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings National of Academy of Science**, v.92, p. 10836-10840, 1995.

WERNECK, G.L.; RODRIGUES, L.; SANTOS, M.V.; ARAUJO, I.B.; MOURA, L.S.; LIMA, S.S.; GOMES, R.B.; MAGUIRE, J.H.; COSTA, C.H. The burden of *Leishmania chagasi* infection during an urban outbreak of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 83, p. 13-18, 2002.

- WIESGIGL, M.; CLOS, J. The heat shock protein 90 of *Leishmania donovani*. **Medical Microbiology Immunology** , v.190, p.27-31, 2001.
- WILSON, M.E.; YOUNG, B.M.; ANDERSEN, K.P.; WEINSTOCK, J.V.; METWALI, A.K.M.; DONELSON, J.E. A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates cellular immune response. **Infection Immunity**, v.63, p.2062-2069, 1995.
- WINCKER, P.; RAVEL, C.; BLAINEAU, C.; PAGÉS, M.; JAUFFRET, Y.; DEDET, J.P.; BASTIEN, P. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. **Nucleic Acids Research**., v. 24, p. 1688-1694, 1997.
- WINCKER, P.; RAVEL, C., BRITTO, C., DUBESSAY, P.; BASTIEN, P.; PAGES, M.; BLAINEAU, C. A direct method for the chromosomal assignment of DNA markers in *Leishmania*. **Gene**. v.194, p.77-80, 1997.
- WOLFSBERG, T.G.; LANDSMAN, D. Expressed sequence tags (ESTs). **Methods Biochemical Analysis**, v.43, p.283-301, 2001.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2000). Disponível em : www.who.int/home-page.
- XIE, T.; DING, D.; TAO, X.; DAFU, D. The relationship between synonymous codon usage and protein structure. **FEBS Letters** , v.437, p.164, 1998.
- XU, D.; MCSORLEY, S.J.; CHATFIELD, S.N.; DOUGAN, G.; LIEW, F.Y. Protection against *Leishmania major* infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA-AroD-) **Immunology**, v.85, p.1-7, 1995.
- YOUNG, D.G.; DUNCAN, M.A. Guide to identification and geographic distribution of *Lutzomia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South Africa (Diptera: Psychodidae). **American Entomology Institute**, Associated Publishers, 1994.
- ZAMBRANO-VILLA, S.; ROSALES-BORJAS, D.; CARRERO, J.C.; ORTIZ-ORTIZ, L. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 272-278, 2002.

[ZEINER, G.M.; STURM, N.R.; CAMPBELL, D.A.](#) Exportin 1 mediates nuclear export of the kinetoplastid spliced leader RNA. **Eukaryotic Cell**, v. 2, p. 222-230, 2003.

ZHANG, M.; HISAEDA, H.; KANO, S.; MATSUMOTO, Y.; HAO, Y.P.; LOOARESUWAN, S.; AIKAWA, M.; HIMENO, K. Antibodies specific for heat shock proteins in human and murine malaria. **Microbes and Infection**, v. 3, p.363-367, 2001.

[ZHU, X.Z.; ZHAO, W.F.; BURKHODER, A.; GRAGEROV, C.M.; OGATA, M.E.; GOTTSMAN; HENDRICKSON, W.A.](#) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. **Science**, v. 272, p.1606-1614, 1996.

4 - CAPÍTULOS

CAPÍTULO I

IDENTIFICAÇÃO *in silico* E *in vitro* DE DOMÍNIOS ANTIGÊNICOS EM HSP70 DE *Leishmania chagasi*

Ana Paula Pimentel Cassilhas², Cynthia Rayol de Andrade¹, Valdir de Queiroz Balbino, Daniela Santos Lóssio Bezerra, Igor Chaves Cananéa, Marcílio Gomes Filho, Márcio Lins Galdino, Maria da Conceição Barbosa Guerra, Marília A. Lima, Maria Mileide Andrade Montenegro, Rafael Araújo de Queiroz, Eliete Cavalcanti da Silva¹, Giovanna Negromonte Torquato, Paulo Paes de Andrade.

GENTROP – Grupo de Pesquisas em Genética e Biologia Molecular de Doenças Tropicais, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Laboratório de Genética Molecular e Unidade de Genômica, Recife, Pernambuco, Brasil.

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Histologia e Embriologia, Laboratório de Cultura de Células, Recife, Pernambuco, Brasil.

Manuscrito a ser submetido para publicação no:

Molecular and Biochemical Parasitology

CAPÍTULO I

IDENTIFICAÇÃO *in silico* E *in vitro* DE DOMÍNIOS ANTIGÊNICOS EM HSP70 DE *Leishmania chagasi*

Ana Paula Pimentel Cassilhas², Cynthia Rayol de Andrade¹, Valdir de Queiroz Balbino, Daniela Santos Lóssio Bezerra, Igor Chaves Cananéa, Marcílio Gomes Filho, Márcio Lins Galdino, Maria da Conceição Barbosa Guerra, Marília A. Lima, Maria Mileide Andrade Montenegro, Rafael Araújo de Queiroz, Eliete Cavalcanti da Silva¹, Giovanna Negromonte Torquato, Paulo Paes de Andrade.

GENTROP – Grupo de Pesquisas em Genética e Biologia Molecular de Doenças Tropicais, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Laboratório de Genética Molecular e Unidade de Genômica, Recife, Pernambuco, Brasil.

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Histologia e Embriologia, Laboratório de Cultura de Células, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Autor-correspondente: Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, 50670-901, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

Telefone: +81 32718520/ 32718521

Telefax: +81 32718569

e-mail: paulacassilhas@aol.com

Lista de abreviaturas: LIT, liver infusion tryptose (infusão de fígado e triptose); PCR, polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase); cDNA, DNA complementar; pb, pares de bases; ORF, open reading frame (quadro aberto de leitura); aa, aminoácido; NCBI, National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para Informação em Biotecnologia); IPTG isopropil-tiogalactosídeo; D.O., densidade ótica; PBS/BSA, salina tamponada com fosfato/albumina sérica bovina; TMB, tetrametilbenzidina; SDS, sulfato de sódio dodecila; kDa, kiloDalton.

IDENTIFICAÇÃO *in silico* E *in vitro* DE DOMÍNIOS ANTIGÊNICOS EM HSP70 DE *Leishmania chagasi*

RESUMO

As proteínas de choque térmico (HSP), grupo de proteínas evolutivamente conservadas, desempenham papéis essenciais tanto em processos imunes normais como em respostas imunes específicas. Esta atividade imunoestimulatória vem sendo atribuída à região mais divergente de toda a molécula, a carboxi-terminal, com um número elevado de determinantes antigênicos indicando grande concentração de epitopos lineares de linfócitos B.

No presente trabalho, após sequenciamento da *Leishmania chagasi* foi identificada a HSP70 citoplasmática (**70cit**), por estudo de similaridade. O *cluster* representando o gene completo foi formado por clones de diferentes tamanhos, sendo possível a cobertura de todas as regiões da molécula. A análise da reatividade de soros de pacientes com leishmaniose visceral (LV) contra os diversos clones permitiu identificar uma nova região antigênica na HSP70 de *L. chagasi*, na porção mediana, a 5' do epitopo imunodominante EADDRA.

Palavras – chave: *Leishmania chagasi*; HSP70; epitopo de linfócito B; sorodiagnóstico; leishmaniose visceral.

e-mail: paulacassilhas@aol.com

INTRODUÇÃO

As proteínas de choque térmico (HSP), também chamadas proteínas do estresse, foram inicialmente reconhecidas por sua expressão aumentada após exposição a elevadas temperaturas [1]. Estas proteínas têm sido identificadas como antígenos de um grande grupo de patógenos [2], estando também associadas com a imunopatologia de doenças auto-imunes [3]. As HSP estão presentes em organismos procariotos e eucariotos e são altamente conservadas no que se refere à sua estrutura primária, mecanismo de regulação e funções bioquímicas [4]. As diferenças na resposta imune contra as HSP podem refletir a forma específica pela qual os patógenos interagem com o sistema imune, no que diz respeito ao reconhecimento de diferentes epitopos ao longo da molécula e ao envolvimento, nesta resposta, de grupos funcionais distintos de linfócitos [5]. Dentre as famílias das HSP, a HSP70 se constitui em uma das mais expressas e de maior propriedade imunogênica, desempenhando um destacado papel na indução da resposta imune protetora contra as leishmanioses [6,7]. Alguns determinantes antigênicos da HSP70 de *Leishmania* foram identificados através da utilização da técnica de pinos peptídicos [8,9,10] e através do seqüenciamento e triagem imunológica [11].

Neste trabalho, foram analisadas as propriedades antigênicas de todas as regiões da HSP70 de *L. chagasi*, utilizando produtos gênicos de diversos tamanhos que foram testados contra um *pool* de soros de pacientes com leishmaniose visceral submetido a imunoadsorções seletivas. Este trabalho faz parte do Programa

Genoma Nordeste (ProGeNE) de sequenciamento de EST de *L. chagasi*, tendo como principais abordagens, o estudo das regiões antigênicas da HSP70 do parasita em questão, bem como a análise comparativa entre regiões divergentes e conservadas da referida proteína nesta espécie e de outros tripanosomatídeos, bem como de organismos não-relacionados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos parasitas e identificação taxonômica de *L. chagasi*

Promastigostas de *L. chagasi* foram isolados por punção medular de cães infectados, do Município de Patos (Paraíba - Brasil), crescidos em meio de cultura LIT suplementado com soro fetal bovino 20% (v/v), 0,1% (p/v) de antibióticos (penicilina e estreptomicina) e 0,2% (v/v) de hemoglobina em estufa a 20°C. A clonagem reprodutiva foi realizada por diluição limitante em meio LIT; após 20 dias, os poços positivos foram empregados para expansão em estufa a 26°C. Após alcançarem a fase exponencial de crescimento, o DNA dos parasitas foi extraído com DNAZOL (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. A identificação foi feita através de PCR, utilizando os *primers* E (5'- CCA GTT TCC CGC CCC G-3') e F (5'- GGG GTT GGT GTA AAA TAG G-3') [12] que produzem um fragmento de 800 pb, da região do mini-círculo (cinetoplasto), característico da espécie *L. chagasi*.

Biblioteca de cDNA

O RNA total dos parasitas expandidos após a clonagem foi extraído com TRIZOL (Invitrogen) e o RNAm purificado por cromatografia de afinidade (Invitrogen). A construção da biblioteca de cDNA foi realizada com o sistema Superscript (Invitrogen) em plasmídeo pSPORT1 como vetor de clonagem. Três frações de cDNA foram obtidas, através da cromatografia de coluna para fracionamento por tamanho de cDNA, com o objetivo de clonar insertos com mais de 500pb. As frações foram ligadas separadamente ao vetor pré-cortado, com as enzimas *NotI* e *Sall* e em seguida, foi feita a eletroporação em *E. coli* DH10B (ELETROMAX DH10B, Invitrogen).

Seqüenciamento

Os clones foram cultivados em 1ml de meio Luria Bertani (LB) 2x a 37°C, sob agitação, por 20h e os plasmídeos extraídos por lise alcalina, filtração e precipitação em álcool isopropílico [13]. Para a reação de seqüenciamento foram utilizados 5µl (200 ng) da extração do cDNA plasmideal, empregando o *kit* BigDye, versão 2.0 ou 3.0 (Applied Biosystems), como recomendado pelo fabricante, tendo como primer o T7 na concentração de 3,2 pmol/µl. O analisador ABI3100 Prism (Applied Biosystems) foi empregado para a produção das seqüências.

Processamento e anotação

Após a análise da imagem do gel de agarose e extração da seqüência de DNA, os dados do seqüenciador foram automaticamente processados. A análise da qualidade das bases na seqüência foi realizada pelo programa PHRED [14],

aplicando como limite inferior para aceitação de bases o valor 20. O programa VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) foi utilizado para a remoção do vetor das regiões flanqueadoras. A montagem dos *clusters* foi realizada com o programa CAP3 [15] e o programa BLASTx [16] permitiu a tradução nos seis quadros de leitura e a comparação com o banco de dados não redundantes do GenBank. O ponto de corte utilizado na anotação por busca de similaridade foi e^{-20} .

Foi realizada a busca pela palavra-chave HSP70 no banco não redundante. O alinhamento local foi realizado através do programa BLASTx para identificação e comparação das seqüências anotadas do NCBI, de espécies pertencentes à família *Trypanosomatidae*.

Busca por prováveis epitopos na HSP70 citoplasmática de *L. chagasi*

A seqüência do *cluster 70cit* de *L. chagasi* foi alinhada com seqüências de HSP70 de tripanosomatídeos através do programa BLASTx e posteriormente foi feita a identificação das porções mais divergentes em toda a extensão da proteína.

Soros

As amostras de sangue foram obtidas de um *pool* de 25 pacientes com LV. Todos os pacientes apresentavam a forma clínica clássica da doença e os soros foram positivos por imunofluorescência indireta (IFI), teste de aglutinação direta (DAT), *Western blot* e ELISA. Soros de indivíduos saudáveis foram usados como controle negativo.

Preparo das amostras

Após a categorização funcional dos *clusters*, foi feita a identificação dos que apresentavam similaridade para HSP70. Os clones transformantes foram localizados e as alíquotas foram expandidas até atingir a fase exponencial (D.O. 0.2-0.3 a 660 nm) em meio LB, suplementado com ampicilina a 50µg/ml, pH 7.5 em sistema de batelada a 37°C, sob agitação orbital. A indução da expressão protéica foi feita com adição de IPTG 0,5M por 3 horas a 37°C. A cultura da bactéria não transformada foi crescida nas mesmas condições, com exceção do uso de antibióticos. As amostras bacterianas transformadas e não transformadas foram lisadas pela solubilização com tampão de lise (β – mercaptoetanol, SDS, glicerol e azul de bromofenol) ou submetidos ao ultra-som.

Western blot

Após separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (P-Immobilon Millipore) e tratadas como recomendado pelo fabricante. O bloqueio foi feito com PBS/BSA 1% sob agitação a 37°C por 30 minutos. As membranas foram incubadas com um *pool* de soros de leishmaniose visceral na diluição de 1:300 por 1h a 37°C, previamente adsorvidos contra um sonicado da bactéria não transformada. O segundo anticorpo utilizado foi a proteína A / peroxidase (SIGMA) na diluição 1:5000 por 1h a 37°C. O ensaio foi revelado com TMB.

Dot blot

As amostras de promastigotas de *L. chagasi*, bactérias não transformadas e transformadas com os clones expressando HSP70 foram lisados com tampão de lise, sem glicerol e azul de bromofenol. Foram aplicados 3µl de cada lisado sobre discos de nitrocelulose. Após a secagem total das amostras na membrana, os discos foram bloqueados, incubados com os soros previamente adsorvidos contra sonicados de cada uma das várias bactérias transformadas, e tratados conforme descrito para o *Western blot*.

RESULTADOS

Entre os 1449 clusters gerados pelo ProGeNE, 7 tiveram similaridade com HSP, com base nos resultados da anotação primária. Destes, apenas um foi similar à HSP70 citoplasmática de *Leishmania*, e continha 2290 bases, representando a região 5'-não traduzida completa (bases 1 a 184), a região codificante (base 185 a 2148) e a parte inicial da região 3'-não traduzida (bases 2149 a 2290) (Fig. 1). A seqüência de aminoácidos, deduzida a partir dos nucleotídeos do consenso mostrou identidade de 99%, positividade de 99%, score 1285 e e-value 0.0. O *cluster* foi montado a partir das seqüências de 17 clones e a seqüência de consenso obtida foi deduzida sempre a partir da superposição de pelo menos 3 clones, exceto por um pequeno trecho no terço inicial da região codificante (da base 849 à base 980).

Os prováveis quadros de leitura para expressão da proteína HSP70 foram em seguida identificados nos insertos de todos os 17 clones: 10 deles apresentaram o quadro +1, 3 apresentaram o quadro +2 e os últimos 4 apresentaram o quadro +3. Todos os clones contêm pelo menos parte da região codificante da HSP70, mas apenas os clones 2, 4, 5, 6 e 15 contêm a região 5'-não traduzida completa, incluindo parte da sequência do mini-exon (Fig.1).

Apenas 6 dos 17 clones expressaram a proteína reconhecida pelo *pool* de soros humanos de LV (Fig.2). Destes, 3 estavam no quadro de leitura esperado e 3 apresentaram outros quadros de leitura. Os clones 1 e 8 apresentaram duas bandas reativas no *Western blot*, mas o peso molecular de cada proteína recombinante foi considerado o da banda de maior peso (Fig.2). Os clones 1, 4, 7, 8 e 17 apresentaram peso molecular de, respectivamente, 45,4, 78,2, 23,7, 62,9 e 64,4 kDa, tanto pelo cálculo a partir do número de aminoácidos, como pela inferência a partir da migração no gel de SDS-poliacrilamida (Fig.2).

A imunoadsorção do *pool* de soros com sonicação do clone 4, cujo produto contém a HSP70 completa, elimina a reação do *pool* contra todos os produtos gênicos dos clones estudados (Fig. 3). Da mesma forma, a imunoadsorção com sonicação do clone 1, cujo produto não contém os primeiros 800 aminoácidos da HSP70, também elimina a reatividade contra todos os clones. A imunoadsorção contra o clone 7, cujo produto gênico é o menor de todos os estudados, mas ainda contém o epitopo imunodominante previamente descrito [10,17], não eliminou a reação contra os produtos gênicos maiores. Curiosamente, a imunoadsorção com os clones 8 e 17, cujos produtos gênicos têm peso molecular

intermediário aos do clone 1 e 4, não eliminou completamente a reação contra os produtos gênicos destes mesmos clones.

Entre o início do clone 1 e o do clone 7 (Fig.4), foi encontrada apenas uma região divergente. Entre o clone 7 e a extremidade carboxi-terminal da molécula, porém, foram identificadas pelo menos 3 regiões divergentes entre *L. chagasi* e diversos tripanosomatídeos. Observou-se uma elevada conservação de seqüências de aminoácidos entre as 6 espécies de *Leishmania* comparadas, em quase toda a extensão da proteína e, para as 2 espécies mais distantes de *Trypanosoma*, quando apenas a porção amino-terminal é comparada (Fig.4).

A figura 5 faz uma sinopse da distribuição das regiões divergentes da HSP70, utilizando o número absoluto de discrepâncias observadas, para cada aminoácido, na comparação da HSP70 de *L. chagasi* com as seqüências de HSP70 de 7 tripanosomatídeos (acima do eixo horizontal: *L. donovani*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. tarentolae*, *T. cruzi* e *T. brucei*) e de 11 organismos não aparentados aos tripanosomatídeos (abaixo do eixo horizontal: *Rhynchopus sp.*, *Setaria digitata*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia Malayi*, *Dicentrarchus labrax*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea ariakensis*, *Manduca sexta*, *Trichoplusia ni*, *Rhizopus stolonifer* e *Schizosaccharomyces pombe*).

O epitopo imunodominante EADDRA foi encontrado fazendo parte da região carboxi-terminal (aminoácido 519 a 524) (Fig.4) e bastante divergente dos hexapeptídeos equivalentes nos demais tripanosomatídeos comparados. O único aminoácido invariável (4^a. posição no hexapeptídeo), em todas as seqüências, foi o ácido aspártico).

DISCUSSÃO

A HSP70 é considerada a mais conservada de todas as proteínas presentes nos seres vivos [18] mas, paradoxalmente, constitui um dos principais antígenos (em alguns casos, até dominante) em diversas doenças parasitárias e bacterianas [7,8,19,20]. O estudo detalhado das regiões antigênicas da HSP70 pode fornecer informações importantes para a melhoria do sorodiagnóstico e a pesquisa de vacinas. A montagem do *cluster 70cit* foi feita com a superposição freqüente de 3 ou mais seqüências, garantindo a boa qualidade e uma baixa probabilidade de que as seqüências de aminoácidos discutidas no trabalho possam estar erradas. Apenas um segmento do *cluster*, entre os resíduos 769 e 1145, foi obtido com a superposição de um pequeno número de clones (Fig.1), o que demonstra a confiabilidade da construção.

A análise da reatividade do *pool* de soros no *Western blot* mostrou que, em alguns casos (clones 7, 8, 10, e 17), não se confirmou o quadro aberto de leitura definido pelo estudo *in silico*. Isto pode ser explicado pelo fato de que a parte inicial das seqüências, usualmente na região do vetor, deve ter baixa qualidade, alterando o quadro correto de leitura. O reconhecimento de duas bandas reativas nos clones 1 e 8 parece ser devido a proteólise, que pode variar desde a hidrólise parcial até a hidrólise completa do produto, sem o comprometimento da antigenicidade [21].

O mapeamento dos epitopos foi definido com os resultados da imunoadsorção cruzada. A imunoadsorção com o sonificado do clone 7 (o menor dos clones) não anulou as reações contra os clones 1 e 4, possivelmente devido à existência de epitopos localizados a 5' do hexapeptídeo EADDRA, entre os aminoácidos 255 e

465. Esta evidência é sustentada pelos resultados da imunoadsorção com o sonicado do clone 1, onde houve a anulação de fragmentos maiores que ele. A imunoadsorção com o sonicado dos clones 8 e 17 não impediu a reação contra os clones 1 e 4, sugerindo a ocorrência de um enovelamento não usual, mesmo após o uso de SDS e beta-mercaptoetanol, escondendo possíveis epitopos (Fig. 3). A imunoadsorção com o sonicado dos clones 1 e 4 anulou a reação contra todos os outros clones, sendo possível propor que, nestes casos, não houve alteração conformacional e que os epitopos foram neutralizados pelos anticorpos dirigidos contra estas porções. Quando a seqüência de HSP70 de *L.chagasi* foi alinhada com as de espécies próximas, confirmou-se a presença do heptapeptídeo NLASSHR, descrito para *L. infantum* como epitopo de linfócitos B [8], no início da seqüência do clone 1 (entre os aminoácidos 255 e 261) (região A da Fig.5). No clone 7 de *L. chagasi* (início no aminoácido 465), que corresponde à região carboxi-terminal, identificamos a presença de 3 regiões altamente divergentes, em cada uma das quais foi mapeado um epitopo. O hexapeptídeo EADDRA localiza-se entre os aminoácidos 529 e 534 (região B, Fig.4 e 5). A região C (Fig.4 e 5), localizada entre os aminoácidos 572 e 591, corresponde a um epitopo descrito em *L. infantum* [22]. Este também é o caso da região D (Fig.4 e 5), no extremo da região carboxi-terminal, a qual se inicia no aminoácido 602 e corresponde a uma região imunodominante descrita em *L. infantum* [8].

A figura 5 faz uma síntese, para a HSP70, da distribuição das regiões homólogas e que concentram divergências, tanto entre tripanosomatídeos (acima do eixo horizontal), como entre espécies filogeneticamente distantes (abaixo do eixo horizontal). As regiões A, B, C e D mapeiam sobre segmentos com alta

concentração de divergência, tanto na metade amino- como na metade carboxiterminal. Uma distribuição similar de regiões altamente divergentes pôde ser observada quando comparações análogas foram feitas para a HSP83 de *L. chagasi* (Galdino, M. *et al.*, manuscrito em preparação).

Nossos resultados mostram a localização de diversos epitopos na HSP70 de *L. chagasi*, já relatados na literatura como antigênicos em outras espécies, bem como uma nova porção responsável por propriedades imunoestimulatórias, localizada a 5' do hexapeptídeo imunodominante EADDRA. Esta contribuição será importante para a caracterização da proteína, desenvolvimento de técnicas sorodiagnósticas mais sensíveis e específicas, para a identificação de antígenos visando a imunoprofilaxia e para o entendimento das alterações na resposta imune do hospedeiro que resultam na patogenia.

AGRADECIMENTOS: Os autores agradecem a inestimável colaboração do Dr. Roberto Werkhäuser, de Mineo Nakasawa e de Edeneide Xavier (Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ/Ministério da Saúde, Recife, Pernambuco, Brasil). Este trabalho foi financiado pela FACEPE (Fundação de Apoio à Ciência do Estado de Pernambuco) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). A.P.P. Cassilhas foi bolsista da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Ministério da Educação e Cultura).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Rico AI, Del Real G, Soto M, Quijada L, Martinez A C, Alonso C, Requena, JM. Characterization of the immunostimulatory properties of *Leishmania infantum* HSP70 by fusion to the *Escherichia coli* maltose-binding protein in normal and nu/nu BALB/c mice. Infect Immun 1998; 66(1):347-52.
- [2] Srivastava PK, Amato, RJ. Heat shock proteins: the 'Swiss Army Knife' vaccines against cancers and infectious agents. Vaccine 2001; 19(17-19):2590-7.
- [3] Todryk SM, Gough MJ, Pockley, AG. Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutic potential. Immunol 2003; 110(1):1-9.
- [4] McClellan AJ, Frydman J. Molecular chaperones and the art of recognizing a lost cause. Nat Cell Biol 2001, 3(2): E51-3.
- [5] Minowada G and Welch W. Variation in the expression and/or phosphorylation of the human low molecular weight stress protein during *in vitro* cell differentiation. J Biol Chem 1995; 270(13):7047-54.
- [6] Rico AI, Angel SO, Alonso C, Requena JM. Immunostimulatory properties of the *Leishmania infantum* heat shock proteins HSP70 and HSP83. Mol Immunol 1999; 36(17):1131-39.
- [7] Andrade CR, Kirchhoff LV, Donelson JE, Otsu K. Recombinant *Leishmania* HSP90 and HSP70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not Chagas' disease patients. J Clin Microbiol 1992; 30 (2): 330-35.

- [8] Quijada L, Requena, JM, Soto, M, Gomez, LC, Guzman F, Patarroyo, ME, Alonso C. Mapping of the linear antigenic determinants of the *Leishmania infantum* hsp70 recognized by leishmaniasis sera. Immunol Lett 1996; 52(2-3): 73-9.
- [9] Quijada I, Requena JM, Soto M, Alonso C. Analysis of the antigenic properties of the *L. infantum* HSP70; design of synthetic peptides for specific serodiagnosis of human leishmaniasis. Immunol Letters 1998, 63: 169-74.
- [10] Wallace GR, Ball AE, MacFarlane J, El Safi SH, Miles MA, Kelly JM. Mapping a visceral leishmaniasis-specific immunodominant B-cell epitope of *Leishmania donovani* HSP70. Infect Immun 1992; 60 (7): 2688-93.
- [11] Amorim AG, Carrington M, Miles MA, Barker DC, de Almeida ML. Identification of the C-terminal region of 70kDa heat shock protein from *Leishmania (Viannia) braziliensis* as a target for the humoral immune response. Cell Stress Chaperones 1996; 1(3): 177-87.
- [12] Lambson B, Smyth A, Barker D. Sequence homology within a minicircle class of the *Leishmania donovani* complex. Mol Biochem Parasitol 1999; 101 (1-2): 229-32.
- [13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning : a Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
- [14] Ewing BL, Hillier M, Wendl P, Green P. Base –calling of automated sequencer tracer using *Phred*. I. Accuracy assessment. Genome Res 1998; 8 (3):175-85.
- [15] Huang X and Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program. Genome Res 1999; 9 (9): 868-77.

- [16] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(17): 3389-402.
- [17] Andrade PP, Andrade CR. Heat shock proteins in visceral leishmaniasis. In: van Eden W, Young DB, editors. *Stress Proteins in Medicine*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996; 308-26.
- [18] Gupta RS, Golding GB. Evolution of HSP70 gene and its implications regarding relationships between archaebacteria, eubacteria and eukaryotes. *J Mol Evol* 1993;37(6): 573-82.
- [19] Zhang M, Hisaeda H, Kano S, Matsumoto Y, Hao YP, Loocaresuwan S, Aikawa M, Himeno K.. Antibodies specific for heat shock proteins in human and murine malaria. *Microbes Infect* 2001; 3(5):363-67.
- [20] Skeiky AW, Guderian JA, Benson DR, Bacelar O, Carvalho EM, Kubin M, Badaró R, Trinchieri G, Reed SG. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulatory human peripheral blood mononuclear cells to Express a Th-1 type cytokine profile and to produce interleukin 12. *J Exp Med* 1995; 181: 1527-37.
- [21] Enfors SO. Control of *in vivo* proteolysis in the production of recombinant proteins. *Trends Biotechnol* 1992;10(9):310-15.
- [22] Perez-Alvarez MJ, Larreta R, Alonso C, Requena J.M. Characterisation of monoclonal antibody recognising specifically the HSP70 from *Leishmania*. *Parasitol Res* 2001; 87 (11): 907-10.

LEGENDAS DAS FIGURAS

FIG. 1 – Diagrama representando a composição do *cluster 70cit*, que inclui a ORF completa da HSP70 de *L. chagasi*. Todos os clones estão representados na posição em que suas extremidades 5' não traduzidas se inserem no *cluster*. As regiões 5' não traduzida e 3' não traduzida estão destacadas nas extremidades do *cluster*. A posição do hexapeptídeo EADDRA (seta) está indicada para todos os clones. Fonte: Queiroz, 2003.

FIG. 2 – Reatividade no *Western blot* do pool de soros de pacientes com leishmaniose visceral frente aos produtos gênicos de 6 dos 17 clones que compõem o *cluster 70cit*. Os pesos moleculares (kDa) estão indicados à esquerda da figura. Os clones 1 e 8 apresentaram 2 bandas reativas, mas o peso molecular considerado para cada proteína foi o da banda de maior peso.

FIG. 3 – Reatividade do *pool* de soros de pacientes com leishmaniose visceral após imunoabsorção cruzada, de acordo com a semelhança antigênica dos 6 produtos gênicos. A diagonal (negrito) contém as reações homólogas (soro imunoabsorvido contra um produto gênico e testado sobre este mesmo produto). (+) indica reação e (∅) indica ausência de reação. Lc = *L. chagasi*. NT = *E.coli* DH10B não transformada.

FIG. 4 – Alinhamento das regiões mediana e carboxi-terminal das seqüências deduzidas de aminoácidos (entre os aa 241 e 654) da HSP70 de *L. chagasi* com

aquelas de outros tripanosomatídeos. As áreas sombreadas (A, B, C e D) indicam regiões já descritas (para *L. infantum*) como antigênicas e imunogênicas, além de altamente divergentes, tanto entre espécies próximas, como entre *Leishmania* e *Trypanosoma*. A = aa 255 a 261; B = aa 529 a 534 (hexapeptídeo EADDRA); C = aa 572 a 591; D = aa 602 a 654. O início das seqüências dos produtos dos clones 1 e 7 está indicado com setas.

FIG. 5 – Histograma comparativo das regiões homólogas e divergentes ao longo da seqüência completa de aminoácidos da HSP70. As barras verticais representam o número absoluto de alterações observadas, para cada aminoácido, na comparação com as seqüências de HSP70 de 12 tripanosomatídeos (acima do eixo horizontal) e as de 12 organismos não aparentados aos tripanosomatídeos (abaixo do eixo horizontal), tomando-se como referência a seqüência de aminoácidos deduzida para *L. chagasi*. Tanto os tripanosomatídeos como os demais organismos foram selecionados entre os 30 primeiros, cujas HSP70, ou suas ortólogas, apresentaram maior similaridade com a HSP70 de *L. chagasi*. Os números nas extremidades indicam o primeiro e o último aminoácido da HSP70 de *L. chagasi*. A, B, C e D indicam as regiões descritas na figura 4, que mapeiam sobre segmentos com alta concentração de divergência.

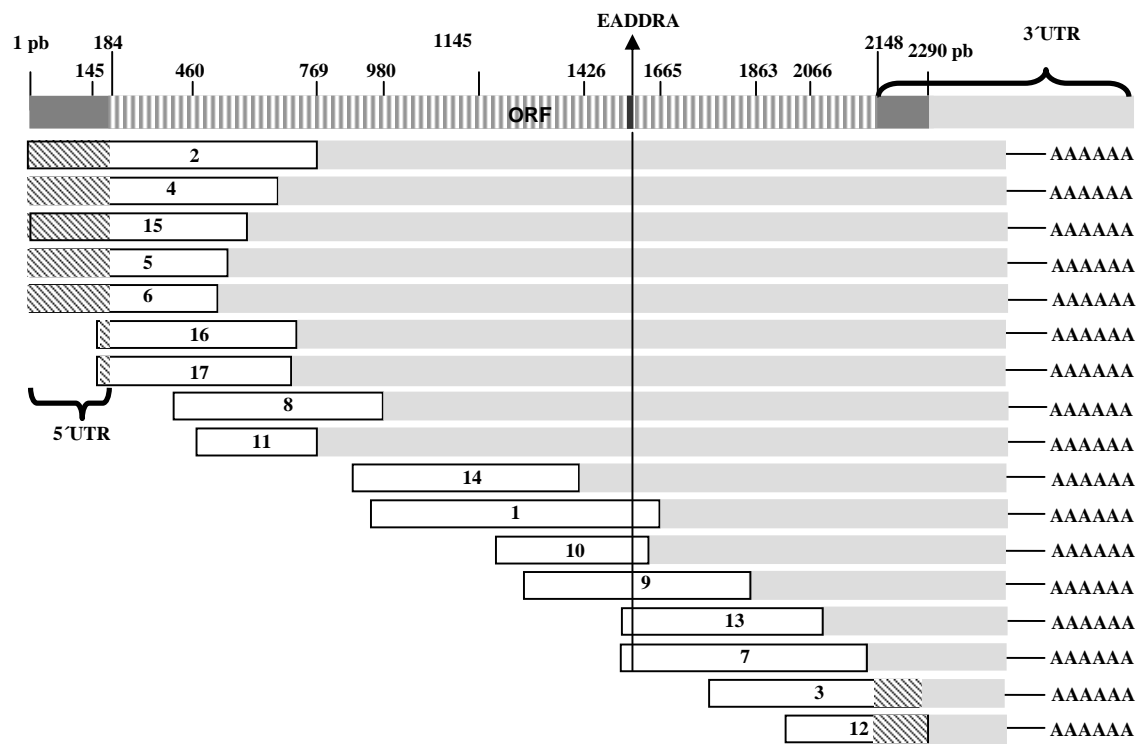


FIGURA 1

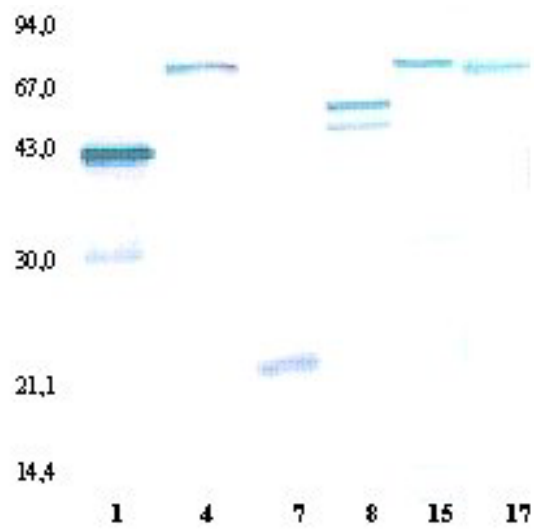


FIGURA 2

		Antígeno						
		1	4	7	8	17	Lc	NT
Imunoadsorção	1	∅	∅	∅	∅	∅	+	∅
	4	∅	∅	∅	∅	∅	+	∅
	7	+	+	∅	∅	∅	+	∅
	8	+	+	∅	∅	∅	+	∅
	17	+	+	∅	∅	∅	+	∅
	NT	+	+	+	+	+	+	∅

FIGURA 3

			Clone 1		
L.chagasi	241	TFFTTEEFKRKNK	A	GNLASSHR	ALRRRLRTACERAKRTLSSATQATIEIDALFENVDFQATI 300
L.donovani	240		G 299
L.tarentolae	241	C.T.	I..... 300
L.infantum	240	A 299
L.amazonensis	241	S D..... 300
L.braziliensis	241	D.S.	A..... D..... 300
T.cruzi	241	SH.D	D.TT.Q	A..... D..... 300
T.brucei	241	AH	D.S.NL	A..... I..... 300
L.chagasi	301	TRARFEELCGDLFRSTIQPVERVLQDAKMDKRSVHDVVLVGGSTRIPKVQSLVSDFFGGK			360
L.donovani	300			359
L.tarentolae	301			360
L.infantum	300	ARA			359
L.amazonensis	301	N			360
L.braziliensis	301			360
T.cruzi	301	G.L	A..... MQ..... 360
T.brucei	301	G.L	A..... MQ..... 360
L.chagasi	361	ELNKSINPDEAVAYGAAVQAFILTTGGKSKQTEGLLLLDVTPPLTLGIETAGGVMTALIKRN			420
L.donovani	360			419
L.tarentolae	361			420
L.infantum	360			419
L.amazonensis	361			420
L.braziliensis	361			420
T.cruzi	361			S..... 420
T.brucei	361	X	A..... 420
L.chagasi	421	TTIPTKKSQIFSTYADNQPGVHIQVFEGEAMTKDCHLLGTFDL			Clone 7
L.donovani	420			SGIPPAPRGVPQIEVT 480
L.tarentolae	421			480
L.infantum	420			L..... 479
L.amazonensis	421			480
L.braziliensis	421	Y	S..... 480
T.cruzi	421			480
T.brucei	421	S	T..... 480
L.chagasi	481	FDDL DANGILNVS AEEKGTGKR NQITITNDKGR LSKDEIERMVNDAMKYEADDR AQRDRVE			B
L.donovani	480			539
L.tarentolae	481			KE.E..... 540
L.infantum	480			E.K..... 539
L.amazonensis	481			K.A..... 540
L.braziliensis	481	D.K	S...QA.KE.E..D 540
T.cruzi	481	V	AD...SE.A...SQ.KE.E.ID 540
T.brucei	481	S	V...AD...S.A...E.K.HVXXID 540
L.chagasi	541	AKNGLENYAYS MKN TLGDSNVSGKLDSDKATLNKEIDVTLEWLSSNQEATKEEYEHKQK			C
L.donovani	540			599
L.tarentolae	541	V	G	EA...N...S..... 600
L.infantum	540	S	E...V...A..... 599
L.amazonensis	541	T.S	EAA..... 600
L.braziliensis	541	IS.P.A	E...EA...A.EAA.S.N...S.....Q... 600
T.cruzi	541	F.V	VNEP.A...IEEA.N.ITSAVEEA.Q.NN...S...R... 600
T.brucei	541	F	IN.P.A...A.NAVTTAVEEA.R.ND...SL...N.R... 600
L.chagasi	601	ELESVCNPIMTKMYQSMGGAGGMPGMPDMSGMSGGAGPAGGASSGPKVEEVD			D
L.donovani	600			653
L.tarentolae	601	DI	A	G...A..... 657
L.infantum	600	A	G..... 653
L.amazonensis	601	N	GA	-A...S...R..... 652
L.braziliensis	601	NT	G.MG	.DA..... 663
T.cruzi	601	NL.T	G	-...GPG.P...N.S--S..... 653
T.brucei	601	G.A	LS	G...GD...GPG.G.M.G.-A..... 661

FIGURA 4

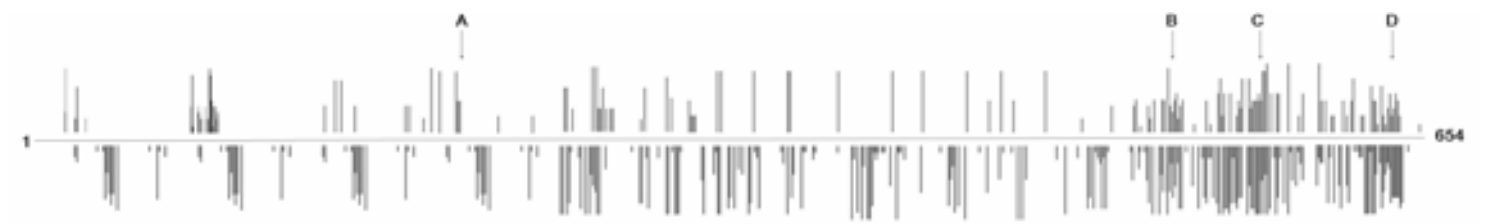


FIGURA 5

CAPÍTULO II

Epitopos, sítios de *trans-encadeamento* e poli-adenilação na HSP83 de *Leishmania chagasi*: uma análise *in silico*.

Galdino², M.L.; Cassilhas, A.P.P.; Andrade, C.R¹.; Balbino, V.Q.; Guerra, M.C.;
Lima, M.A.; Silva, E.C¹.; Torquato, G.N.; Queiroz, R.A.; Cananéa, I.C.; Andrade,
P.P.

GENTROP – Grupo de Pesquisas em Genética e Biologia Molecular de Doenças
Tropicais, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas,
Departamento de Genética, Laboratório de Genética Molecular e Unidade de
Genômica, Recife, Pernambuco, Brasil.

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas,
Departamento de Histologia e Embriologia, Laboratório de Cultura de Células,
Recife, Pernambuco, Brasil.

Manuscrito a ser submetido para publicação no:

Genome Research

CAPÍTULO II

Epitopos, sítios de *trans-encadeamento* e poli-adenilação na HSP83 de *Leishmania chagasi*: uma análise *in silico*.

Galdino², M.L.; Cassilhas, A.P.P.; Andrade, C.R¹.; Balbino, V.Q.; Guerra, M.C.; Lima, M.A.; Silva, E.C¹.; Torquato, G.N.; Queiroz, R.A.; Cananéa, I.C.; Andrade, P.P.

GENTROP – Grupo de Pesquisas em Genética e Biologia Molecular de Doenças Tropicais, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Laboratório de Genética Molecular e Unidade de Genômica, Recife, Pernambuco, Brasil.

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Histologia e Embriologia, Laboratório de Cultura de Células, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Autor correspondente: marciogaldino@yahoo.com.br

Epitopos, sítios de *trans-encadeamento* e poli-adenilação na HSP83 de *Leishmania chagasi*: uma análise *in silico*.

Resumo

A compreensão dos mecanismos de controle da expressão gênica e do processamento de RNA em *Leishmania chagasi* é importante na abertura de novos caminhos para o desenvolvimento de drogas e vacinas para o controle da leishmaniose visceral. A abundância de informação genética fornecida pelo Programa Genoma Nordeste (ProGeNE) para este parasita permite um estudo amplo de vários aspectos da genética e da biologia molecular do parasita. Neste estudo, os *clusters* montados com seqüências relativas aos genes de HSP83 foram detalhadamente comparados a genes similares de outros tripanossomatídeos, em busca de padrões que identificassem os sinais de *trans-encadeamento* e poli-adenilação, ainda não definidos para este parasita. Os resultados, amparados por uma análise similar envolvendo outros *clusters* completos do transcriptoma de *L. chagasi*, identificam claramente os sítios de processamento nos genes estudados, não apenas na *L. chagasi*, mas nos demais tripanossomatídeos para os quais seqüências de bases compreendendo as regiões 5'- não traduzida ou 3'- não traduzida para os genes em questão estão disponíveis em bancos públicos. Adicionalmente, as regiões variáveis na seqüência de aminoácidos da HSP83, evidenciadas pelo alinhamento com seqüências similares em outros tripanossomatídeos e em organismos não relacionados, são candidatas a albergar um ou mais epitopos de linfócitos B e T, reconhecidos na infecção natural pelo parasita no homem e no cão.

Introdução

As leishmanioses são enfermidades parasitárias causadas por protozoários unicelulares do gênero *Leishmania* e mostram duas formas clínicas mais freqüentes, a forma cutânea e a forma visceral (Grimaldi *et al.*, 1989; Uribe, 1999). Apesar da leishmaniose visceral ser considerada um grave problema de saúde pública, o seu controle ainda é bastante deficiente e há um aumento de novos casos a cada ano, assim como a expansão da enfermidade para áreas previamente indenes (Werneck *et al.*, 2002). Na resposta imune contra o parasita, observa-se uma intensa produção de anticorpos contra as proteínas de choque térmico HSP70 e HSP83 (membro da família da HSP83), tanto no homem quanto no cão, muitas vezes específicos contra o agente etiológico em questão (Andrade *et al.*, 1990; Andrade e Andrade, 1996; Angel *et al.*, 1996; Quijada *et al.*, 1996; Skeiky *et al.*, 1995; Wallace *et al.*, 1992). Outros estudos demonstraram que as HSP70 e HSP90 são as principais responsáveis pela imunidade tumor-específica (Rico *et al.*, 1999). Curiosamente, as proteínas de choque térmico são bastante conservadas e a imunogenicidade/ antigenicidade observada nas infecções naturais, assim como em imunizações para obtenção de anticorpos monoclonais (Nemoto *et al.*, 1997), pode parecer surpreendente. Entretanto, os epitopos e regiões antigênicas ou imunogênicas descritas previamente para estas proteínas foram associados, na maior parte, às regiões fortemente divergentes, dispersas na seqüência de aminoácidos (Andrade e Andrade, 1996; Angel *et al.*, 1996; Nemoto *et al.*, 1997; Rico *et al.*, 1999).

Nestes parasitas, a transcrição é policistrônica e os genes não apresentam introns, eliminando o requerimento de cis-encadeamento (Stiles 1999). Por outro lado, uma seqüência curta de 39 nt é trans-encadeada na extremidade 5' de todos os RNAm maduros dos tripanossomatídeos. Na ausência da modulação da transcrição via atividade promotora individual, mecanismos pós-transcricionais envolvendo as regiões flanqueadoras não-codificantes (regiões 5'- não traduzida, 3'- não traduzida e seqüências intergênicas) são os principais determinantes da regulação da abundância do RNAm e de sua meia-vida (Kelly et al, 2001;Boucher et al., 2002). De fato, mecanismos pós-transcricionais parecem ser o principal, se não o único, meio de controle da expressão gênica entre os membros desta família (Teixeira, 1998).

Neste trabalho, a seqüência completa da HSP83 de *L. chagasi* (fornecida pelo banco de dados do ProGeNE) foi comparada às de proteínas similares de outros tripanossomatídeos e de organismos não relacionados, objetivando identificar regiões divergentes, e os epitopos e regiões antigênicas ou imunogênicas descritas previamente para esta proteína foram mapeados sobre a seqüência de aminoácidos. A identificação precisa dos sítios de trans-encadeamento e poli-adenilação em HSP83 e em outros genes do parasita permitiram a comparação das regiões flanqueadoras destes sítios entre vários tripanossomatídeos, evidenciando a existência de seqüências flanqueadoras parcialmente conservadas.

Resultados

A busca no banco de dados do ProGeNE identificou um *cluster* contendo a palavra chave HSP83 no campo de anotação primária, denominado **83Lc** e formado a partir das seqüências de 36 clones individuais. A extremidade 5' do *cluster* exibiu parte da seqüência do mini-exon, usualmente transencadeada no RNAm maduro dos tripanosomatídeos, enquanto a extremidade 3' continha uma seqüência poli-A longa, indicando que o *cluster* representava todo o RNAm para a HSP83 da *L. chagasi*.

A comparação da seqüência de nucleotídeos do *cluster* **83Lc** com as seqüências de nucleotídeos depositadas no NCBI aponta para uma elevada conservação de todo o *cluster*: o gene com maior identidade de seqüências (98,0%) codifica para a HSP83 de *L. infantum* (gi 20372842), produzindo *score* = 3927 e *e-value* = 0 para BLASTn, com apenas nove *gaps* em 2138 nt. A comparação da seqüência de aminoácidos deduzida para o *cluster* mostrou também elevada similaridade com as HSP83 previamente descritas para *Leishmania*: a proteína com maior similaridade é, mais uma vez, a HSP83 de *L. infantum* (spQ25393), que apresentou *e-value* = 0, *score* = 1343, identidade de aminoácidos = 97,0% e positividade = 98,0%, com apenas 3 *gaps* em 702 aa.

As seqüências de aminoácidos da HSP83 entre espécies de cinetoplastídeos e de outros organismos filogeneticamente não-aparentados, mas cuja HSP83 apresentava elevada similaridade à de *Leishmania*, foram analisadas simultaneamente através de um histograma comparativo (Fig. 1). Foi constatada a existência de várias regiões conservadas entre cinetoplastídeos que, em geral,

também são conservadas nas demais espécies. Por outro lado, observou-se que as seqüências divergentes aparecem distribuídas ao longo de toda a extensão da proteína.

A disponibilidade no banco de dados do ProGeNE de *clusters* contendo regiões 5'- não traduzida completas de genes de *L. chagasi* favorece o estudo das regiões flaqueadoras dos sítios de trans-encadeamento e de poli-adenilação. A busca por seqüências similares à região 5'- não traduzida e à região 3'- não traduzida da HSP83 de *L. chagasi* nos bancos de dados do NCBI e do Wellcome Trust Sanger Institute retornou um número limitado de seqüências. A comparação destas seqüências demonstrou que as regiões não traduzidas do gene da HSP83 são bastante conservadas entre as espécies de *Leishmania*, com os níveis de conservação sendo sensivelmente reduzidos quando incluídas representantes de outros níveis taxonômicos (dados não apresentados). O alinhamento das regiões intergênicas de HSP83 de *Leishmania* disponíveis mostrou que o sítio acceptor de *encadeamento*, identificado inequivocamente em *L. chagasi* pela presença do mini-exon, é flaqueado à esquerda (5') por seqüências muito conservadas da região intergênica (Fig. 2). Ao final de um trecho rico em pirimidinas observa-se a presença de um decanucleotídeo (CACCGCGATA) que antecede o sítio de *encadeamento* e é conservado entre todas as espécies linhagens de *Leishmania* para as quais há seqüências disponíveis da região intergênica imediatamente anterior à região 5'- não traduzida da HSP83. Repetições com números variáveis de citosinas ou do dinucleotídeo CA imediatamente anteriores ao decanucleotídeo ocorrem em linhagens de *L. infantum*. Quando a vizinhança do sítio de trans-encadeamento foi analisada em diversos genes (Fig. 3), observou-se uma

conservação intragênica, porém não intergênica: a região é rica em G e C e alguns dinucleotídeos aparecem com frequência (CA, CC e CG), mas um padrão claro de conservação entre os vários genes não parece existir.

De forma análoga, o sítio de poli-adenilação do gene da HSP83, claramente definido pela comparação do RNAm completo, transcrito do gene em *L. chagasi*, com seqüências genômicas, é sucedido por uma região intergênica bastante conservada entre várias espécies de *Leishmania*. (Fig. 4). Como observado para o sítio aceptor de trans-encadeamento, quando a vizinhança do sítio de poliadenilação é analisada para diversos genes (Fig. 5) observa-se uma conservação intragênica razoável, ainda que muito mais discreta, porém não intergênica: a região é rica em adeninas e os trinucleotídeos CAA e GAA, além dos dinucleotídeos CA e GA, que aparecem com frequência, mas um padrão claro conservado entre os vários genes também não parece existir.

Discussão

As HSP de *Leishmania* estão entre as primeiras proteínas de choque térmico a serem reconhecidas como antígenos (Andrade et al, 1990, Wallace et al, 1992, Angel1996, Requena 2000). Como já detectado para HSP70, as regiões divergentes da HSP83 seriam mais antigênicas/imunogênicas, contendo epitopos específicos para linfócitos B (Nemoto 1997). Angel et al. (1996), empregando soros de cães infectados com *L. infantum* e antígenos recombinantes deste parasita, determinaram uma região imunodominante que mapeia exatamente sobre uma região pouco conservada da HSP83 (região A, Fig.1). Nemoto et al.

(1997) desenvolveram um painel de anticorpos monoclonais contra uma região previamente identificada como imunogênica na HSP90 humana (ortóloga da HSP83 de *Leishmania*). Ela mapeia sobre uma região divergente da HSP83 e dois dos três epítopos definidos nela estão exatamente sobre os conjuntos de octapeptídeos mais variáveis (região B, Fig.1). A segunda região imunogênica descrita na HSP90 humana também mapeia sobre uma região altamente divergente na extremidade carboxi-terminal da proteína (região C, Fig.1).

A disponibilidade de *clusters* completos na extremidade 5' para vários genes, gerados pelo ProGeNE, permitiu a identificação inequívoca do sinal de trans-encadeamento, composto por um segmento rico em pirimidinas, mais o dinucleotídeo AG (Curotto de Lafaille, 1992). Entretanto, após cuidadosa análise dos dados sintetizados nas figuras 2 e 3, não foi possível identificar um padrão na região 5' do sítio acceptor de trans-encadeamento. Um estudo recente (Requena 2003) propôs uma seqüência de consenso para o sítio acceptor de trans-encadeamento em *Leishmania*, semelhante ao padrão envolvido no cis-encadeamento, o que estaria de acordo com o conceito geral de que ambos os processos estejam evolutivamente relacionados. O padrão observado para HSP83, entretanto, não segue o consenso proposto, nem o de outros genes de *L. chagasi* analisados, embora esteja próximo a ele. O alinhamento múltiplo das seqüências da região 5' do sítio acceptor de trans-encadeamento do RNA de HSP83 em 3 espécies de *Leishmania* (Fig.2) indicou a existência de uma região rica em polipirimidinas, semelhante a encontrada em *L. chagasi* (Ramamoorthy 1996). Definida como de vital importância para o trans-encadeamento do RNA da Gp63, esta seqüência apresenta alguns resíduos de adenina, que representam

pontos potenciais de ramificação. Em nosso caso (Fig.3), foram encontrados motivos CCA e GCA no curto trecho representado da região intergênica, essencialmente idênticos aos observados em Gp63. Em outro estudo (Curotto de Lafaille, 1992), foi empregado um gene repórter e segmentos de tamanhos distintos da região intergênica anterior ao gene de tubulina de *L. enrietti*, demonstrando-se que uma região de 222 bases imediatamente anterior ao sítio de trans-encadeamento era essencial para a expressão do gene repórter no parasita. A região podia ser substituída por um trecho de poli-pirimidina sintético e outros sinais aparentemente não seriam necessários para o trans-encadeamento. A ausência, em nossa análise, de um padrão claro de bases numa região contígua ao sítio de trans-encadeamento para o conjunto de genes estudado, apóia em princípio a proposta de Curotto de Lafaille et al. (1992), mas a ocorrência freqüente de certos di- e trinucleotídeos sugere uma cautela em aceitar esta hipótese até que um número maior de seqüências esteja disponível e que experimentos de transfecção demonstrem que as regiões contíguas ao sítio não modulam positiva- ou negativamente o processo de trans-encadeamento.

A grande conservação da região IR (região intergênica) após o sítio de poli-adenilação, entre *L. major* e *L. infantum* (Fig.4), indica que ela deve ter um papel importante no processo de poli-adenilação (Quijada et al., 2000). A disponibilidade de *clusters* completos na extremidade 3' para vários genes, gerados pelo PROGENE, permitiu a identificação inequívoca do sinal de poli-adenilação (Fig. 5). Um estudo sobre a vizinhança do sítio de poli-adenilação do gene da proteína amastigota-específica A2 de *L. donovani* (Charest et al., 1996) define uma seqüência de 15 nucleotídeos que apresentam elevada similaridade com as bases

correspondentes no gene da HSP83 de *L. infantum* e das demais leishmanias estudadas.

O conhecimento aprofundado das seqüências e dos fatores que controlam a expressão gênica em tripanossomatídeos certamente resultará no desenvolvimento de ferramentas moleculares que desvendarão as bases genéticas da infectividade e da patogenia. A investigação *in silico* de seqüências de controle já começou a tirar proveito dos bancos de dados sempre em expansão que resultam dos recentes projetos genoma. Entretanto, um número maior de experimentos de transfecção será necessário para testar até que ponto estas seqüências afetam o processamento do RNA e a eficiência da tradução em *Leishmania*.

Metodologia

O banco de dados de *clusters* do ProGeNE, previamente anotados por comparação automática com as seqüências de aminoácidos depositadas no GenBank (NCBI), foi pesquisado para a palavra-chave HSP. Os resultados foram individualmente analisados, comparando-se a seqüência do *cluster* com as depositadas no banco de dados GenBank pelos programas BLASTx e BLASTn, em busca de *clusters* com região 5'- não traduzida, ORF e região 3'- não traduzida completas (com, no mínimo, 12 adeninas no final da seqüência, caracterizando a cauda poli-A), para a caracterização estrutural e análise da diversidade das seqüências.

As seqüências de HSP83 de 14 tripanossomatídeos e de 14 organismos não aparentados aos tripanossomatídeos, tomando-se como referência a seqüência de aminoácidos deduzida para *L. chagasi*, foram empregadas num alinhamento múltiplo pelo BLASTx. Tanto os tripanossomatídeos quanto os demais organismos foram selecionados entre os 35 primeiros cujas HSP83 ou suas ortólogas apresentaram maior similaridade com a HSP83 de *L. chagasi*.

Os alinhamentos das regiões contíguas aos sítios de trans-encadeamento e poli-adenilação, provenientes de seqüências de genes similares em *Leishmania* foram obtidos pelo uso do programa CLUSTALX.

Agradecimentos: Este trabalho foi parcialmente financiado pela FACEPE (Fundação de Apoio à Ciência do Estado de Pernambuco) e pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), bem como pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/MEC).

Legendas das Figuras

Figura 1: Histograma comparativo das regiões de divergência e conservação ao longo da seqüência completa de aminoácidos de HSP83. As barras verticais representam o número absoluto de alterações observadas, para um dado aminoácido, entre as seqüências de HSP83 de 14 tripanossomatídeos (parte superior) e de 14 organismos não aparentados aos tripanossomatídeos (parte inferior), tomando-se como referência a seqüência de aminoácidos deduzida para

L. chagasi. Tanto os tripanossomatídeos quanto os demais organismos foram selecionados entre os 35 primeiros cujas HSP83 ou suas ortólogas apresentaram maior similaridade com a HSP83 de *L. chagasi*. Os números nas extremidades do eixo representam o primeiro e último aminoácido da seqüência. As regiões A, B e C indicam trechos da proteína já descritos como antigênicos ou imunogênicos e as barras sobre a região B mostram epitopos definidos nesta região (ver Resultados).

Figura 2: Alinhamento dos primeiros 60 nucleotídeos da região intergênica de HSP83 de *Leishmania* imediatamente abaixo (3') do sítio de trans-encadeamento. Os primeiros 10 nucleotídeos estão ressaltados. Há uma elevada conservação da região, para a vizinhança do gene da HSP83, e a presença de adeninas em trinucleotídeos CCA, CGA e GCA na região de poli-pirimidinas.

Figura 3: Alinhamento dos 20 nucleotídeos vizinhos ao sítio de trans-encadeamento dos genes da HSP83, da α -tubulina, da proteína ribossomal L24, da histona H3 e do gene similar ao do produto gênico Tcc2i18.5 de *Trypanosoma cruzi*. Observa-se uma considerável conservação da região intergênica entre seqüências do mesmo gene, mas não parece haver um padrão conservado entre os vários genes para os 10 nucleotídeos 5' do sítio acceptor de trans-encadeamento.

Figura 4: Alinhamento dos primeiros 60 nucleotídeos da região intergênica de HSP83 imediatamente abaixo (3') do sítio de poli-adenilação. Os primeiros 10

nucleotídeos estão ressaltados. Há uma elevada conservação da região, para a vizinhança do gene da HSP83.

Figura 5: Alinhamento dos 20 nucleotídeos vizinhos ao sítio de poli-adenilação dos genes da HSP83, da α -tubulina e da histona H3. Observa-se uma discreta conservação da região intergênica entre seqüências do mesmo gene, mas não parece haver um padrão conservado entre os vários genes para os 10 nucleotídeos 3' do sítio de poli-adenilação.



FIGURA 1

```

L. infantum1      CTTCATCTCTGCCGCC--TTCCTCTGCACCCTTCT-CGCACGT-TTCGCTTGATCATCGACCCCCCCCCCCCCACACACACACACACACCGGAT A
L. infantum2      CTTCATCTCTGCCGCC--TTCCTCTGCACCCTTCT-CGCACGT-TTCGCTTGATCATCGACCCCCCCCCCCCC ---ACACACAC--ACACCGGATA
L. infantum3      CTTCATCTCTGCCGCC--TCCCTCTG-ACCCTTCT-CGCACGT-TTCGCTTGATCACCACCGCCCGCCACCGGAT A-----
L. major1         CTTCATCTCTGCCGCC--TCCCTCTGCACCCTTCT-CGCACGT-TTCGCTTGGTCACCGACCGCCCGCCACCGGAT A-----
L. major2         CTTCATCTCTGCCGCC--TCCCTCTGCACCCTTCT-CGCACGT-TTCGCTTGGTCACCGACCGCCCGCCACCGGAT A-----
L. major3         CTTCATCTCTGCCGCC--TCCCTCTGCACCCTTCTTTCGCACGT-TTCGCTTGGTCACCGACCGCCCGCCACCGGAT A-----
L. amazonensis  CTTCATCTCGTCGCCCTCCCTCTGTACCTCATCAACACACGGACTTTACAGATC ACCGACCGCCCGCCACCGGAT A-----
***** * ****          ***** **  ** * **** *      * ** ***** **

```

FIGURA 2

		IR	5' -UTR
HSP83	<i>L. chagasi</i>GAGCTTTCGCC	
	<i>L. infantum</i>	ACACCGCGATAGAGCTTTCGCC	
	<i>L. major</i>	ACACCGCGATAGAGCTTTCGCC	
	<i>L. amazonensis</i>	CCACCACGATAGAGCTCTTCGG	
α-tubulina	<i>L. chagasi</i>GCTCTTCGCTC	
	<i>L. infantum</i>	AAAAACGCGCAGCTCTTCGCTC	
	<i>L. major</i>	AACAACGCGCAGCTCTTCGCTC	
Proteína ribossomal L24	<i>L. chagasi</i>GCAGCC	
	<i>L. infantum</i>	CACGTCATACAGCAGCC	
	<i>L. major</i>	GTCACATAGCAGCAGCC	
Histona H3	<i>L. chagasi</i>GCCTCCACAGC	
	<i>L. infantum</i>	CACACGCCGCAGCCTCCACAGC	
	<i>L. major</i>	CGCAGTCCGCAGCCTCCACAGC	
Similar ao produto gênico de <i>T. cruzi</i> Tcc2i18.5	<i>L. chagasi</i>GGATCGAGCTC	
	<i>L. infantum</i>	TGACTGAGGTAGGATCGAGCTC	
	<i>L. major</i>	TGACCGATGCAGGATCGAGCTC	

FIGURA 3

<i>L. infantum</i> ¹	GCGCCAAAGGCACAAAGAGAGGGAAAGTGGCATGCGCCTGCGCCTCACGGTTTCCGTGCT
<i>L. infantum</i> ²	GCGGCAAAGGCACAAAGAGAGGGAAAGCGACATGCGCCTGCGCCTCACGGTTTCCGTGCT
<i>L. major</i> ¹	GCGGCAAATGCACAAAGAGAGGGAAAGTGACACGCGCCTGCGCCTCACGGTTTCCGTGCT
<i>L. major</i> ²	GCGGCAAATGCACAAAGAGAGGGAAAGTGACACGCGCCTGCGCCTCACGGTTTCCGTGCT
<i>L. major</i> ³	GCGGCAAATGCACAAAGAGAGGGAAAGTGACACGCGCCTGCGCCTCACGGTTTCCGTGCT
<i>L. major</i> ⁴	GCGGCAAATGCACAAAGAGAGGGAAAGTGACACGCGCCTGCGCCTGAGGGTTTCCGTGCT

*** **** ***** * ** ***** * *****

FIGURA 4

		3' - UTR	IR
HSP83	<i>L. chagasi</i>	GCCGTCAACG GAAA	
	<i>L. donovani</i>	GCCGTCAACG G	
	<i>L. infantum</i>	GCCGTCAACG GAAA CCGCCAAAGG	
	<i>L. major</i>	GCCGTCAACG GAAA CCCGCAATG	
α - tubulina	<i>L. chagasi</i>	GTTGATAGAT GAA	
	<i>L. donovani</i>	GTTGATAGAT GAA GCTCGTGCCG	
	<i>L. infantum</i>	GTTGATAGAT GAA GAGAAAGAAA	
Histona 3	<i>L. chagasi</i>	GATCATCAG- CAA	
	<i>L. major</i>	GATCATCAGC CAACAACAGGAA	
	<i>L. infantum</i>	GATCATCAG- CAA AACACAGGAA	
	<i>L. mexicana</i>	GATCATCAG- GAG ACATCGCACTC	

FIGURA 5

Referências

- Andrade, C.R.; Andrade, P.P.; Wright, E.P. 1990. Use of recombinant HSP-like polypeptides in the diagnosis of visceral leishmaniasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **85**:92.
- Andrade, P.P.; Andrade, C.R. Heat shock proteins in visceral leishmaniasis. In Stress Proteins in Medicine, Marcel Dekker Inc., p. 308-326. 1996.
- Angel, S.O., Requena, J.M., Soto, M., Criado, D., Alonso, C. 1996. During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. Acta Trop. **62**: 45-56.
- Boucher, N. Wu, Y., Dumas, C., Dubé, M., Sereno, D., Breton, M., Papadopoulou, B. 2002. A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. J. Biol. Chem. **277**: 19511-19520
- Charest, H., Zhang, W.W., Matlashewski, G. 1996. The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3'-untranslated region. J. Biol. Chem. **271**: 17081-17090.
- Curotto de Lafaille, M.A., Laban, A., Wirth, D.F. 1992. Gene expression in *Leishmania*: analysis of essential 5' DNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **89**: 2703-2707.
- Kelly, B.L.; Nelson, T.N.; McMaster, W.R. 2001. Stage-specific expression in *Leishmania* conferred by 3' untranslated regions of *L. major* leishmanolysin genes (GP63). Mol Biochem Parasitol. **116**:101-104.

- Nemoto, T., Sato, N., Iwanari, H., Yamashita, H., Takagi, T. 1997. Domain structures and immunogenic regions of the 90-kDa heat-shock protein (HSP90). Probing with a library of anti-HSP90 monoclonal antibodies and limited proteolysis. *J. Biol. Chem.* **272**: 26179-2687.
- Quijada, L.; Requena, J.M.; Soto, M.; Gómez, L.C.; Guzman, F.; Patarroyo, M.E.; Alonso, C. 1996. Mapping of the linear antigenic determinants of the *Leishmania infantum* hsp70 recognized by leishmaniasis sera. *Immunol. Lett.* **52**: 73-79
- Quijada, L., Soto, M., Alonso, C., Requena, J.M.. 2000. Identification of a putative regulatory element in the 3'-untranslated region that controls expression of HSP70 in *Leishmania infantum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **110**: 79-91.
- Ramamoorthy, R., Donelson, J.E., Wilson, M.E. 1996. 5' sequences essential for trans-splicing of msp (gp63) RNAs in *Leishmania chagasi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **77**: 65-76.
- Requena, J.M., Alonso, C., Soto, M. 2000. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. 2000. *Parasitol. Today.* **16**: 246-250.
- Requena, J.M., Quijada, L., Soto, M., Alonso, C. 2003. Conserved nucleotides surrounding the trans-splicing acceptor site and the translation initiation codon in *Leishmania* genes. *Exp. Parasitol.* **103**: 78-81.
- Rico, A.I., Angel, S.O., Alonso, C., Requena, J.M. 1999. Immunostimulatory properties of the *Leishmania infantum* heat shock proteins HSP70 and HSP83. *Mol. Immunol.* **36** : 1131- 1139.

- Skeiky, A.W.; Benson, D.R.; Guderian, J.A.; Whittle, J.A.; Bacelar, O., Carvalho, E.M.; Reed, S.G. 1995. Immune response of leishmaniasis patients to heat shock proteins of *Leishmania* species and humans. *Infect Immun.* **63**: 4105-4114.
- Stiles, J.K.; Hicock, P.I.; Shah, P.H.; Meade, J.C. Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. 1999. *Ann Trop Med Parasitol.* **93**:781-807.
- Teixeira, S.M.R. 1998. Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**: 1503-1516.
- Uribe, S. 1999. The status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex and possible implications for *Leishmania* transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz.***94**:729-734.
- Wallace, G.R.; Ball, A.E.; MacFarlane, J.; El Safi, S.H.; Miles, M.A.; Kelly, J.M. 1992. Mapping a visceral leishmaniasis-specific immunodominant B-cell epitope of *Leishmania donovani* HSP70. *Infect. Immune.* **60**: 2688-2693.
- Werneck ,G.L.; Rodrigues, L.; Santos, M.V.; Araujo, I.B.; Moura, L.S.; Lima, S.S.; Gomes, R.B.; Maguire, J.H.; Costa, C.H. 2002. The burden of *Leishmania chagasi* infection during an urban outbreak of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop.* **83**:13-18.

CAPÍTULO III

O transcriptoma de *Leishmania chagasi*: lições das primeiras

10.000 sequências

Montenegro, M. M. A.¹; Andrade, C. R.¹; Andrade, H. M.³; Araújo, D.⁶; Bezerra, J. M. D.⁵; Cananea, I. C.¹; Cassilhas, A. P. P.¹; Castro J. A. F.³; Cavalcante, J. C.⁸; Galdino, M. L.¹; Gomes Fo. M.¹; Guerra, M. C.¹; Benko-Iseppon, A. M.⁹; Lima, M. A.¹; Melo, M. A.¹; Mesquita, E. R. L.²; Montarroyos, A. V. V.⁷; Monte S. J. H.³; Oliveira, D. M.⁴; Queiroz, R. A.¹; Santos, C. F.⁶; Santos, E. O.⁷; Silva, E. C.¹; Torquato, G. N.¹; Balbino, V. Q.¹; Andrade, P. P.¹.

¹Laboratório de Genética Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco; ²Laboratório de Biologia e Genética Molecular, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão; ³Laboratório de Imunobiologia, Universidade Federal do Piauí; ⁴Laboratório de Genoma, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará; ⁵ Laboratório de Genética Molecular, Universidade Estadual do Maranhão; ⁶LABIME, Departamento de Biologia, Universidade Federal da Paraíba; ⁷Laboratório de Genoma, Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária; ⁸ Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente de Estado de Pernambuco. ⁹Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco.

Manuscrito a ser submetido para publicação no :

International Journal for Parasitology

O transcriptoma de *Leishmania chagasi*: lições das primeiras

10.000 sequências

Montenegro, M. M. A¹; Andrade, C. R.¹; Andrade, H. M.³; Araújo, D.⁶; Bezerra, J. M. D.⁵; Cananea, I. C.¹; Cassilhas, A. P. P.¹; Castro J. A. F.³; Cavalcante, J. C.⁸; Galdino, M. L.¹; Gomes Fo. M.¹; Guerra, M. C.¹; Benko-Iseppon, A. M.⁹; Lima, M. A.¹; Melo, M. A.¹; Mesquita, E. R. L.²; Montarroyos, A. V. V.⁷; Monte S. J. H.³; Oliveira, D. M.⁴; Queiroz, R. A.¹; Santos, C. F.⁶; Santos, E. O.⁷; Silva, E. C.¹; Torquato, G. N.¹; Balbino, V. Q.¹; Andrade, P. P.¹.

¹Laboratório de Genética Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco; ²Laboratório de Biologia e Genética Molecular, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão; ³Laboratório de Imunobiologia, Universidade Federal do Piauí; ⁴Laboratório de Genoma, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará; ⁵ Laboratório de Genética Molecular, Universidade Estadual do Maranhão; ⁶LABIME, Departamento de Biologia, Universidade Federal da Paraíba; ⁷Laboratório de Genoma, Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária; ⁸ Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente de Estado de Pernambuco. ⁹Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco.

Correspondência: Paulo P. Andrade, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Recife, Pernambuco, Brasil. E-mail: andrade@ufpe.br

O transcriptoma de *Leishmania chagasi*: lições das primeiras

10.000 sequências

Resumo

A *Leishmania chagasi* é o agente etiológico da leishmaniose visceral na Região Neotropical, infectando o homem e outros mamíferos. No Brasil, acomete cerca de 4.500 pessoas por ano, com a grande maioria dos casos sendo observada na Região Nordeste. Apesar do impacto da leishmaniose visceral na saúde pública no mundo, a terapêutica ainda é bastante precária e não existem vacinas para o homem e para os reservatórios. O estudo do transcriptoma da *L. chagasi* pode abreviar a obtenção de novos alvos terapêuticos, contribuindo para o controle da leishmaniose visceral. Neste trabalho, descreve-se a análise de 9.888 seqüências deste parasita, geradas a partir de uma biblioteca de cDNA de promastigotas. As seqüências foram avaliadas quanto à qualidade e agrupadas em 1.022 clusters com o auxílio dos programas Phred e Cap3, respectivamente. O conteúdo médio de guanina e citosina (GC) observado foi de 58,98%, encontrando-se entre os valores normalmente observados nos tripanosomatídeos. A comparação dos clusters de *L. chagasi* com aquelas do banco não redundante de seqüências do GenBank possibilitou a anotação funcional de 311 supostos produtos gênicos, classificados em 18 categorias funcionais. Dentre as classes que apresentaram maior representatividade, destacam-se as proteínas ribossomais (16,87%), as de transporte (15%) e aquelas relacionadas com a produção e conversão de energia

(13,12%). A análise do uso de códons da *L. chagasi* evidenciou a utilização diferencial dos códons ricos em guanina e citosina, seguindo o padrão observado em outras espécies de *Leishmania*. O volume de seqüências geradas nessa primeira etapa do seqüenciamento de *L. chagasi* representa um incremento de cerca de 50% no número de seqüências de *Leishmania* depositadas no GenBank, aumentando o repertório de genes disponíveis para a realização de experimentos que atestem as suas funções no metabolismo da *Leishmania*.

Palavras-chave: *Leishmania chagasi*, leishmaniose visceral, etiquetas de genes expressos (EST), bioinformática, *cluster*, transcriptoma.

1. INTRODUÇÃO

A *Leishmania chagasi*, parasita pertencente à família Trypanosomatidae, é o agente etiológico da leishmaniose visceral americana. A doença ocorre em mais de 80 países da Ásia e África, sul da Europa e América Latina (Lainson e Shaw, 1987; Grimaldi e Tesh, 1993; Silva *et al.*, 2001). No Brasil, são registrados anualmente cerca de 4.000 novos casos dessa endemia, dos quais cerca de 95% ocorrem na região Nordeste (Silva *et al.*, 2001).

As manifestações clínicas da doença em humanos incluem sinais e sintomas como febre, anemia, hepatoesplenomegalia e perda de peso progressiva. A transmissão da *L. chagasi* ocorre pela picada de fêmeas infectadas do inseto *Lutzomyia longipalpis* (Pimenta *et al.*, 1994). O cão doméstico é apontado como um importante reservatório da leishmaniose visceral e deve ser o responsável pela natureza endêmica/epidêmica da doença, contrastando com seres humanos, que são considerados como uma fonte fraca de infecção da *L. chagasi* para os flebotomíneos (De Almeida *et al.*, 2003).

O genoma da *L. chagasi* é relativamente pequeno, da ordem de 35 Mb. Estima-se que o parasita tenha apenas cerca de 8.500 genes, organizados em 35 cromossomos (Wincker *et al.*, 1996). Apesar da importância da doença causada por estes parasitas, no Nordeste brasileiro, nenhum estudo genômico havia sido antes realizado no país. O seqüenciamento do genoma completo da *L. major*, agente etiológico da leishmaniose tegumentar no oriente, está em andamento. Até o momento cinco cromossomos foram seqüenciados (<http://www.sanger.ac.uk>) e suas seqüências estão disponibilizadas no GenBank.

Uma abordagem rápida e suficientemente informativa dos genes de um organismo tem sido a formação de um extenso painel de genes expressos. Embora incompletas e passíveis de erros, as etiquetas de genes expressos (ESTs) são muito significativas na descoberta de genes e geração de informações nos estudos de mapeamento gênico (Ajioka *et al.*, 1998).

O Programa Genoma Nordeste (ProGeNE – <http://www.progene.ufpe.br>), iniciado em 2000 com o apoio de vários órgãos brasileiros de apoio à ciência e tecnologia, vem seqüenciando bibliotecas de cDNA de *L. chagasi*. Neste trabalho, descreve-se os resultados da análise das 9.888 primeiras seqüências produzidas e os clusters formados por estas seqüências. Cerca de 6.500 códons foram utilizados para um estudo de *uso de códon* de *L. chagasi*, bem como o conteúdo GC médio da região codificante e das regiões não codificantes foi determinado. As seqüências que apresentaram similaridade com genes conhecidos foram categorizadas e os genes filogeneticamente restritos à família Trypanosomatidae foram determinados.

2. METODOLOGIA

2.1 Construção da biblioteca

Os parasitas, isolados a partir de punção medular de cães infectados do município de Patos (Paraíba, Brasil), foram crescidos em meio de cultura LIT (Infusão de Fígado e Triptose), suplementado com soro fetal bovino 20%; 0,1 % de antibiótico (penicilina e estreptomicina); e 0,2% de hemoglobina, em estufa a

26°C. Quando os parasitas alcançaram a fase exponencial de crescimento foram lavados com PBS, o RNA total foi extraído com TRIZOL (INVITROGEN) e o mRNA isolado por cromatografia de afinidade. A biblioteca de cDNA foi construída utilizando o sistema SuperScript (INVITROGEN) e o plasmídeo pSPORT1 como vetor de clonagem. Foram obtidos três frações de cDNA, através da cromatografia de coluna para o fracionamento por tamanho de cDNA, com o objetivo de clonar insertos com mais de 500pb. As três frações foram ligadas separadamente ao vetor pré-cortado com as enzimas *Not1* e *Sal1* e a ligação eletroporada em *Escherichia coli* DH10B (Eletromax DH10B, Invitrogen).

2.2 Seqüenciamento

Clones da biblioteca de cDNA de promastigotas em fase exponencial de crescimento foram cultivados em 1 ml de meio Luria Bertani 2 X, a 37°C, sob agitação, por 20h, e os plasmídeos extraídos por lise alcalina, filtração e precipitação em álcool isopropílico. Um volume de 5 µl da extração foi utilizado para a reação de seqüenciamento, empregando os kits BigDye, versão 2,0 e versão 3,0 (Applied Biosystems), essencialmente como recomendado pelo fabricante. O seqüenciador ABI 3100 Prism (Applied Biosystems) foi empregado para a produção das seqüências.

2.3 Processamento e anotação.

Após análise da imagem do gel e extração da seqüência de DNA, os dados do seqüenciador foram automaticamente processados. A análise de qualidade das bases foi realizado pelo programa *Phred* (<http://www.phred.org>). Bases que exibiam *Phred* acima de 20 foram consideradas de boa qualidade. Para trimagem e remoção de vetor das regiões flangeadoras foi utilizado uma cópia local do VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A montagem dos *clusters* foi realizada com o programa CAP3 versão 3. Com o uso de BLASTx os *clusters* foram traduzidos nos seis quadros de leitura e comparados com o banco de dados não redundante do GenBank. O ponto de corte utilizado na anotação por busca de similaridade foi e^{-20} .

2.4 Categorização dos clusters

A categorização funcional dos *clusters* foi realizada utilizando o banco de dados do InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>). *Clusters* que apresentaram similaridade com genes de proteínas desconhecidas e proteínas hipotéticas não foram incluídos na categorização. As 18 categorias geradas foram baseadas nas categorias do KEGG (www.genome.ad.jp/kegg), embora todos os genes de proteínas de transporte tenham sido agrupados em uma só classe. Entretanto, nenhum *cluster* foi agrupado em mais de uma classe.

2.5 Criação da tabela de uso de códon e análise de conteúdo GC

Trinta e um genes com matrizes abertas de leitura (ORF) completas foram utilizados na construção de uma tabela de *uso de códon* de *L. chagasi*. O programa SeqTools versão 8.0 (<http://www.seqtools.dk>) foi utilizado para a construção da tabela. Os resultados da tabela foram comparados ao banco de dados do uso de códons relativos às espécies de tripanosomatídeos, disponibilizados no site Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon>).

A análise do conteúdo GC das regiões codificantes e não codificantes dos 161 *clusters*, bem como a análise diferencial das três distintas regiões dos genes com ORF completas foi realizada utilizando o programa Gene Runner versão 3.05 (<http://www.generunner.com>). As médias de G e C obtidas foram calculadas e os desvios padrões foram determinados.

2.6 Genes filogeneticamente restritos à família Trypanosomatidae

Os *clusters* que apresentaram similaridade significativa com genes descritos em tripanosomatídeos foram analisados e suas similaridades comparadas àquelas encontradas em organismos de outras famílias. Os *clusters* com alta similaridade com genes descritos apenas para *L. major* não foram considerados como filogeneticamente restritos à família Trypanosomatidae.

3. RESULTADOS

3.1 Seqüenciamento de ESTs e Categorização dos clusters de L. chagasi

O seqüenciamento dos produtos de amplificação de uma biblioteca de cDNA de *L. chagasi* produziu inicialmente 9888 *reads*. Estes *reads* entraram na composição de 1022 *clusters* (tamanho médio de 937 nt) que foram comparadas às seqüências depositadas no banco de dados não redundante de proteínas do GenBank. A utilização do programa BLAST do NCBI (National Center for Biothecnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) possibilitou a anotação funcional de 311 homólogos em potencial. Desse total, 161 apresentaram similaridade com genes conhecidos e foram agrupados em 18 categorias funcionais (Figura 1). Dentre as classes que apresentaram maior representatividade estão as de proteínas ribossomais (16,87%), de transporte (15,00%) e aquelas relacionadas à produção e conversão de energia (13,12%). O percentual de identidade entre as seqüências geradas pelo ProGeNE e as seqüências depositadas no GenBank, considerando todas as classes, variou entre 25 e 100%, com média igual a 71,38%.

3.2 Uso de códon e Conteúdo GC

Trinta e um genes, de diversas categorias, que apresentaram ORF completas foram utilizados para construção de uma tabela de uso de códon de *L. chagasi* (Tabela 1). Tendo em vista a riqueza de bases guanina (G) e citosina (C)

encontrada no genoma das espécies de *Leishmania*, foi observada a utilização preferencial dos códons ricos em GC.

Uma análise do percentual de GC nas três regiões distintas do gene, 5' não-traduzida, ORF e 3' não-traduzida, revelou que, em geral, as regiões codificantes são mais ricas em G e C do que as regiões 3' não traduzidas; estas por sua vez, mais ricas em G e C que as regiões 5' não traduzidas. A Figura 2 ilustra esses resultados. As médias percentuais de GC das regiões codificantes e não-codificantes observadas nos 161 clusters analisados foi de 62,64% e 55,33%, respectivamente.

3.3 Distribuição dos Clusters e análise de genes filogeneticamente restritos à família Trypanosomatidae

Dos 161 clusters de *L. chagasi* analisados, 99 (61,5%) apresentaram similaridade com genes descritos para *Leishmania*; 31 (19,25%) com genes descritos para outros tripanosomatídeos; e 31 (19,25%) com genes descritos para organismos de outras espécies (Figura 3).

As buscas realizadas no banco de dados não redundante (*nr*) do GenBank, revelou alguns genes que exibem significativa similaridade em espécies da família Trypanosomatidae e um mínimo de similaridade para outros táxons (Tabela 2). Utilizando esse critério, nove genes foram considerados restritos a tripanosomatídeos, dos quais cinco eram codificadores de proteínas de transporte.

4. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral é uma endemia disseminada em cerca de 100 países do mundo, afetando cerca de 500.000 pessoas a cada ano. O arsenal terapêutico ainda é muito limitado, não existindo também vacinas disponíveis. Apesar do impacto na saúde pública mundial, a busca por novos alvos terapêuticos e vacinais ainda é modesta. A compreensão da importância da abordagem genômica na obtenção de novas informações sobre o parasita e a doença causada por ele é de fundamental importância no estudo da leishmaniose visceral.

Os resultados apresentados neste trabalho derivam de um painel de cerca de 10.000 seqüências de *L. chagasi* produzidas no Brasil, um dos países mais afetados pela leishmaniose visceral. Em conjunto, estas seqüências correspondem a cerca de 50% de todas as informações de seqüências de nucleotídeos de *Leishmania* depositadas no GENBANK. As primeiras 9888 seqüências geraram 1022 *clusters*, restando aproximadamente 4500 seqüências isoladas (*singletons*). Desta forma, em média, os clusters continham cinco *reads* de comprimento médio de 520nt. A redundância observada nas montagens dos clusters garantiu a qualidade média das montagens. Considerando que o número de famílias gênicas até agora descritas para *Leishmania* é pequeno (Stiles, 1999), os clusters devem de fato representar genes de *Leishmania chagasi* e não um consenso de parálogos. O elevado número de clusters obtidos com as primeiras 9888 seqüências (10,33%) reflete a forma peculiar de expressão gênica do

parasita (Cleyton, 2002), que produz em princípio mRNAs para todos os genes de seu genoma, controlando apenas a tradução.

Apenas 311 *clusters* apresentaram similaridade de seqüência com as seqüências do banco *nr* do GenBank. O elevado número de *clusters* sem similaridade pode refletir a estringência do ponto de corte utilizado (e^{-20}). De fato Ajioka *et al.*, (1998) empregaram menor estringência na anotação de genes de *Toxoplasma gondii*, o que determinou a obtenção de um maior número de *clusters* apresentando similaridade com as seqüências do GenBank. Entretanto, consideramos razoável a utilização de um ponto de corte mais elevado na anotação de genes de *L. chagasi*, a fim de reduzir a probabilidade de anotar genes erroneamente. Por outro lado, a principal causa desta grande proporção de genes novos pode dever-se, mais uma vez, à forma particular pela qual a *Leishmania* controla a sua expressão gênica: os mRNAs que na maior parte dos demais eucariotos, são raros, na *Leishmania* e nos outros tripanosomatídeos estão tão representados no citoplasma como qualquer outro mRNA, possibilitando, assim, a produção de cDNAs na biblioteca empregada no estudo e seu seqüenciamento aleatório.

Das 311 seqüências de *L. chagasi* que apresentaram similaridade com aquelas depositadas no GenBank, 150 possuíam função desconhecida e destas cerca de 50% mostraram similaridade com genes de *L. major* para proteínas hipotéticas ou de função desconhecida. Esse resultado é esperado, já que os dois organismos são filogeneticamente próximos e sugere que os genes identificados são específicos do gênero *Leishmania*. Na Tabela 2 foram listados nove genes específicos da família Trypanosomatidae. Outros 11 *clusters* foram identificados

como homólogos apenas a genes com função propostos para *L. major* e que não foram incluídos na tabela para evitar a propagação de anotação primária possivelmente equivocada. Assim, do total de 311 seqüências, até 90 delas (28,94%) podem representar genes específicos de *Leishmania* ou tripanosomatídeos.

Os 161 *clusters* foram categorizados em 18 classes funcionais. A boa representatividade das categorias protéicas já era esperada, considerando que os diferentes mRNAs são igualmente produzidos em *Leishmania*. As classes numericamente mais representadas foram das proteínas aparentemente mais importantes para a sobrevivência do parasita, o que não reflete uma expansão do transcriptoma do parasita para esses genes, mas sim o fato de que estas classes possuem mais elementos em sua composição primária.

A comparação entre a tabela de uso de códons montada a partir da análise de 6551 códons de *L. chagasi* produzidos pelo ProGeNE e aquela encontrada no banco de dados de *codon usage* (<http://www.kazusa.or.jp>), confeccionada a partir de 19 genes (6523 códons) também de *L. chagasi*, demonstrou um percentual de 95% de concordância entre elas. A discreta diferença observada entre as duas tabelas foi na determinação do códon mais utilizado para o aminoácido serina.

O conteúdo GC das *Leishmanias* varia entre 58 e 60% (Stiles, 1999). Nossos dados indicam que há um nítido aumento deste conteúdo nas regiões codificantes, em média 7% superior àquele observado nas regiões 5' e 3' não traduzidas, que pode ser explicado pela distorção do uso de códons naqueles

organismos que apresentam conteúdo GC alto, como ocorre em algumas bactérias (Nakamura *et al.*, 1998).

Dos 161 clusters que apresentaram similaridade com seqüências do GenBank, cerca de um quinto não se mostraram similares a genes previamente descritos em tripanosomatídeos, sugerindo que sejam novos genes desta família, ou ao menos, de *Leishmania*. Estes *clusters* estão distribuídos em todas as categorias funcionais no presente estudo, exceto na categoria de proteínas de superfície, o que reflete o esforço intenso no estudo destas proteínas em *Leishmania*, já que estas proteínas representam o primeiro contato do parasita com seus hospedeiros. Entre os *clusters* que têm similaridade com seqüências de várias espécies de *Leishmania*, dois representam genes previamente descritos como codificadores de proteínas estágio-específicas (proteína de superfície semelhante a amastina e proteína infectiva ao inseto estágio-específica), comprovando que a síntese dos mRNAs ocorre para todos os genes em *Leishmania*, independente do estágio do ciclo em que o parasita se encontra. Foram observados, em cinco categorias de função distintas, nove clusters restritos à família Trypanosomatidae. Destes três são transportadores de aminoácidos, cujos produtos gênicos correspondentes são potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
– FACEPE e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico,

órgãos financiadores do programa de sequenciamento de ESTs de *Leishmania chagasi*.

REFERÊNCIAS

Ajioka, J.W., Boothroyd, J.C., Brunk, B.P., Hehl, A., Hiller, L. Manger, I.D., Marra, M., Overton, G. C., Roos, D.S., Wan, K-L., Waterston R. & Sibly, L.D. (1998). Gene Discovery by Sequencing in *Toxoplasma gondii* Reveals Sequence Restricted to the Apicomplexa. *Genome Res.* 8: 18-28.

Cleyton, C. E. (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *The EMBO Journal.* Vol 21. nº 8: 1881-1888.

Grimald, Jr G., Tesh, R.B. (1993). Leishmaniasis of New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.* 6: 230-250.

Nakamura, Y., Gojobori, T. & Ikemura, T. (1998). Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases. *Nucl. Acids Res.* 26:334.

Lainson, R. and Shaw, J.J.. Evolution, classification and geographic distribution. In Peters, W. and Killick-Kendick, R (1987). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine.* Academic Press, London, pp. 1-20.

Pimenta, P.F.P., Saraiva, E.M.B., Rowton, E., Modi, G.B., Garraway, L.A., Beverly, S.M., Turco, S.J. and Sacks, D.L. (1994). Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Med. Science* 91: 9155-9159.

Silva, E.S., Gontijo, C.M.F., Pacheco, R.S., Fiúza, V.O.P. and Brazil, R.P. (2001). Visceral Leishmaniasis in the metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96: 285-291

Stiles, J.K., Hicock, P.I., Shah, P.H. and Meade, J.C. (1999). Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann.Trop. Med. Parasitol.* 93(8): 781-807.

Wincker, P., C. Ravel, C. Blaineau, M. Pages, Y. Jauffret, J.P. Dedet and P. Bastren (1996). The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res.* 24:1688-1694.

Tabela 1 - Uso de códon de *Leishmania chagasi* – (31 genes: 6.551 codons)

Aminoácido /codon	Codons por1000	Número de aminoácidos	Percentual de aminoácidos	Aminoácido /codon	Codons por 1000	Número de aminoácidos	Percentual de aminoácidos
Ala GCG	39,38	258	46,5	Leu TTG	4,58	30	5,7
GCA	5,34	35	6,3	TTA	0,00		0,0
GCT	10,84	71	12,8	CTG	53,12	348	66,0
GCC	29,16	191	34,4	CTA	0,92	6	1,1
Arg AGG	2,14	14	3,4	CTT	5,65	37	7,0
AGA	0,61	4	1,0	CTC	16,18	106	20,1
CGG	2,29	15	3,6	Phe TTT	4,73	31	11,7
CGA	0,00		0,0	TTC	35,57	233	88,3
CGT	5,34	35	8,4	Pro CCG	26,10	171	62,6
CGC	53,27	349	83,7	CCA	1,98	13	4,8
Asn AAT	2,44	16	6,7	CCT	4,43	29	10,6
AAC	33,89	222	93,3	CCC	9,16	60	22,0
Asp GAT	9,01	59	19,7	Thr ACG	35,72	234	61,3
GAC	36,79	241	80,3	ACA	3,36	22	5,8
Cys TGT	1,22	8	7,1	ACT	3,21	21	5,5
TGC	16,03	105	92,9	ACC	16,03	105	27,5
Gln CAG	30,53	200	96,6	Ser AGT	0,92	6	1,4
CAA	1,07	7	3,4	AGC	18,93	124	29,7
Glu GAG	59,07	387	94,9	TCG	21,22	139	33,3
GAA	3,21	21	5,1	TCA	1,83	12	2,9
Gly GGG	5,19	34	7,2	TCT	6,11	40	9,6
GGA	1,53	10	2,1	TCC	14,81	97	23,2
GGT	14,96	98	20,6	Trp TGG	10,53	69	100,0
GGC	50,83	333	70,1	Tyr TAT	1,22	8	4,2
His CAT	1,83	12	8,3	TAC	28,09	184	95,8
CAC	20,15	132	91,7	Val GTG	55,11	361	69,8
Ile ATA	1,07	7	2,2	GTA	2,14	14	2,7
ATT	6,56	43	13,7	GTT	6,11	40	7,7
ATC	40,30	264	84,1	GTC	15,57	102	19,7
Lys AAG	74,65	489	97,0	End TGA	0,61	4	13,3
AAA	2,29	15	3,0	TAG	1,83	12	40,0
Met ATG	31,14	204	100,0	TAA	2,14	14	46,7

Tabela 2 – Seqüências filogeneticamente restritas à família Trypanosomatidae

Função/ Cluster	Espécie/ e-value para trypanosomatídeos	Espécie/ e-value para não trypanosomatídeos	Provável função
QUINASE/ FOSFATASE			
LCEX020037	<i>Leishmania major</i> e ⁻⁵⁸ <i>Trypanosoma cruzi</i> e ⁻³⁰	<i>Microbulbifer degradans</i> e ⁻¹¹	dUTPase
LIGADORA DE DNA			
LCEX020952	<i>Leishmania major</i> 1e ⁻⁹³ <i>Trypanosoma cruzi</i> 9e ⁻³¹	<i>Homo sapiens</i> 0,003	DNA polimerase I termoestável
TRANSPORTE			
LCEX020065	<i>Leishmania donovani</i> e ⁻¹⁷⁶ <i>Leishmania amazonensis</i> e ⁻¹⁶⁰ <i>Crithydia fasciculata</i> e ⁻¹¹⁹ <i>Trypanosoma brucei</i> 4e ⁻⁶² <i>Trypanosoma equiperdum</i> 9e ⁻⁶²	<i>Arabidopsis thaliana</i> 4e ⁻⁰⁹	Transportador de ionosina- guanosina
LCEX020093	<i>Leishmania donovani</i> 0,0 <i>Leishmania amazonensis</i> 0,0 <i>Crithydia fasciculata</i> e ⁻¹⁷⁶ <i>Leishmania major</i> 1e ⁻⁶⁸ <i>Trypanosoma brucei</i> 1e ⁻⁶² <i>Trypanosoma equiperdum</i> 1e ⁻⁴¹	<i>Mus musculus</i> e ⁻¹⁶	Transportados de nucleosídeo 1.1

LCEX020385	<i>Leishmania major</i> e ⁻⁵⁶ <i>Leishmania donovani</i> e ⁻⁵⁵ <i>Trypanosoma brucei</i> e ⁻⁵²	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e ⁻⁰⁸	Transportador de aminoácido
LCEX020695	<i>Leishmania major</i> e ⁻²³ <i>Leishmania donovani</i> e ⁻²² <i>Trypanosoma brucei</i> e ⁻²⁰	<i>Anopheles gambiae</i> e ⁻⁰⁴	Transportador de aminoácido
LCEX020838	<i>Leishmania major</i> e ⁻²² <i>Leishmania donovani</i> e ⁻²¹ <i>Trypanosoma brucei</i> e ⁻²¹	<i>Caenorhabditis elegans</i> 0,120	Transportador de aminoácido
PROTEÍNA DE MEMBRANA	<i>Leishmania tropica</i> 3e ⁻⁴⁷ <i>Leishmania donovani</i> 6e ⁻⁴⁷ <i>Leishmania amazonensis</i> 6e ⁻⁴⁷ <i>Leishmania infantum</i> 6e ⁻⁴⁷		
LCEX020826	<i>Leishmania guianensis</i> 5e ⁻⁴⁶ <i>Leishmania braziliensis</i> 1e ⁻⁴⁵ <i>Trypanosoma rangeli</i> 2e ⁻⁴⁰ <i>Trypanosoma cruzi</i> 5e ⁻⁴⁰ <i>Trypanosoma brucei</i> 6e ⁻³⁴	<i>Fusobacterium nucleatum</i> 0,100	KMP11
ANTIGÊNICA			
LCEX020990	<i>Leishmania donovani</i> 1e ⁻⁵⁴ <i>Leishmania amazonensis</i> 5e ⁻⁴⁶	<i>Macaca fascicularis</i> 0,012	Proteína infectiva ao inseto estágio específica

Figura 1.

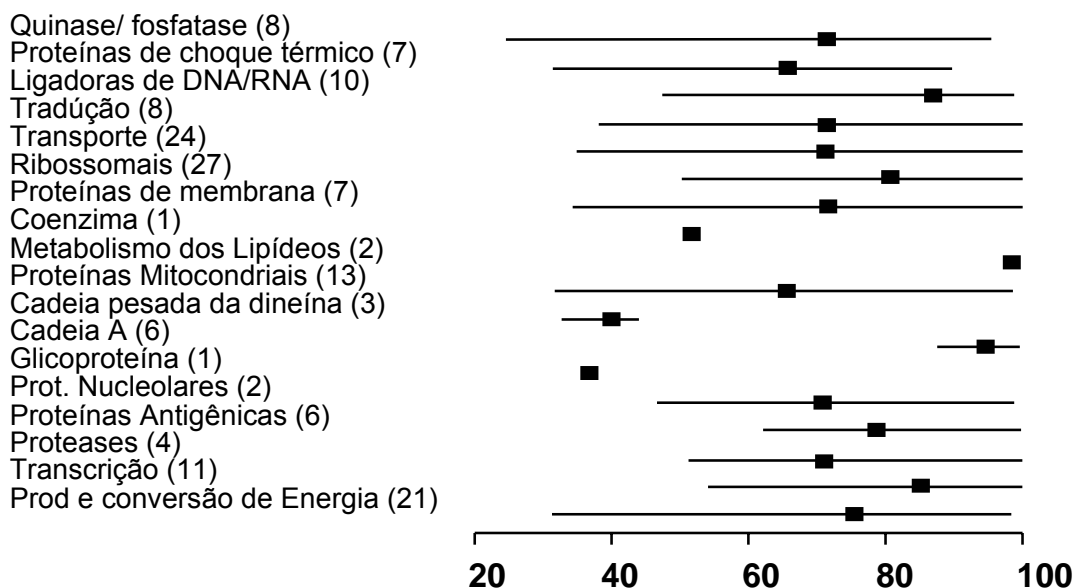


Figura 1. Categorização funcional dos 161 *clusters* de *L. chagasi*. No eixo da abscissa está representado o percentual de identidade que variam de 20 a 100. As barras horizontais indicam os percentuais de identidade para cada categoria, obtidos a partir do BLASTx das seqüências produzidas pelo ProGeNE com as seqüências do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os pontos marcam as médias de identidade para cada categoria funcional. Os valores entre parênteses ao lado das classes significam o número de *clusters* que foram agrupados nas referidos grupos.

Figura 2

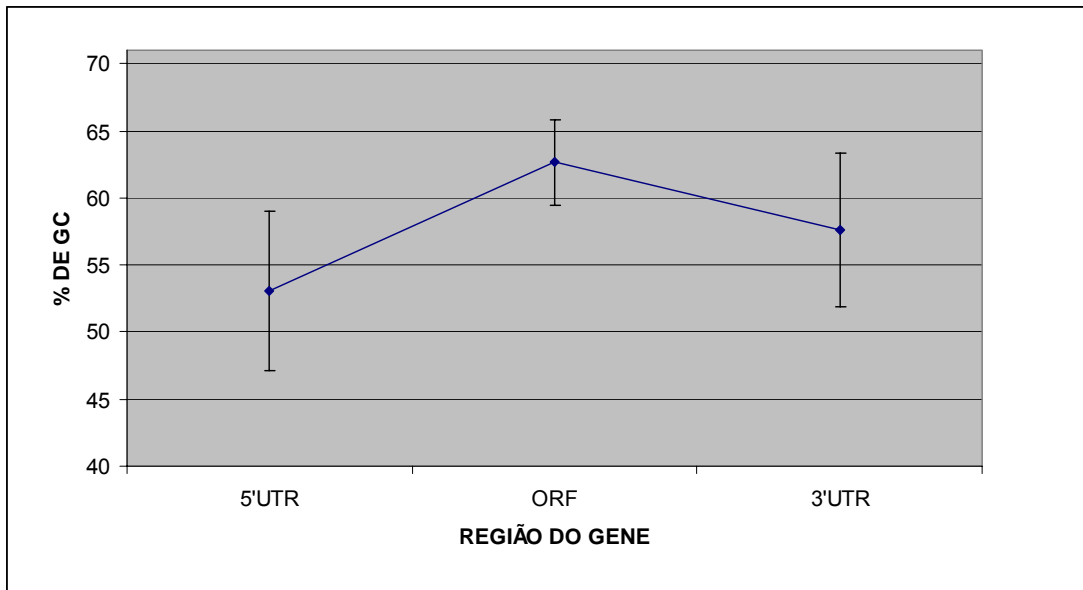


Figura 2. Conteúdo GC médio dos 31 *clusters* de *Leishmania chagasi* que apresentaram ORF completas. Os pontos do gráfico representam as médias de GC nas distintas regiões do gene e as barras verticais que cortam os pontos representam o desvio padrão (para mais e para menos). O gráfico demonstra o elevado conteúdo GC nas regiões codificantes, que é esperado para um organismo rico em GC e que tem um uso de códon distorcido, como é o caso da *L. chagasi*.

Figura 3

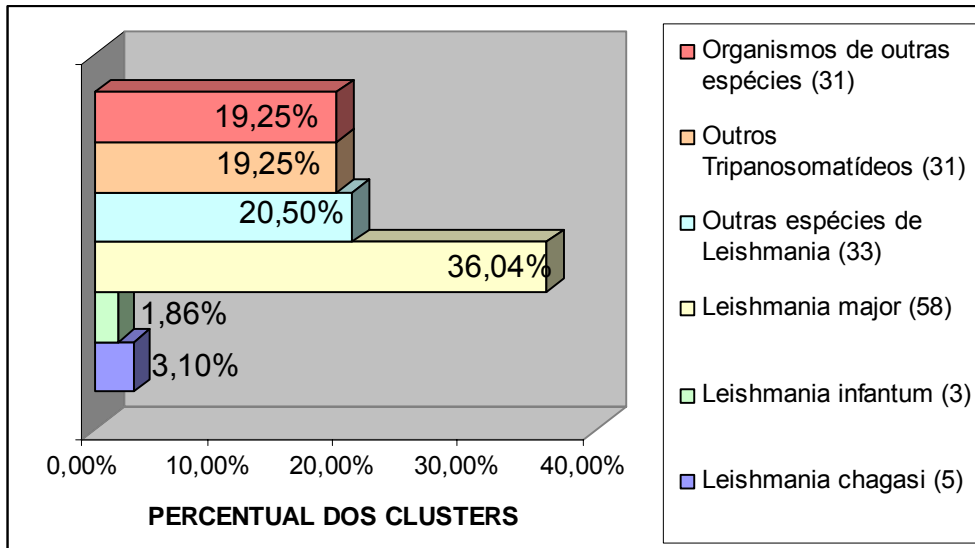


Figura 3. Distribuição, por táxon, dos 161 clusters de uma biblioteca de EST de *L. chagasi* que apresentaram similaridade com genes conhecidos depositados no GenBank. Os números entre parênteses indicam o número de *clusters* em cada classe.

5 - Conclusões

Capítulo I

- As regiões A, B, C e D mapeiam sobre segmentos com alta concentração de divergência, tanto na metade amino- como na metade carboxi-terminal;
- As regiões divergentes entre HSP70 de diferentes tripanosomatídeos também são divergentes entre *L. chagasi* e organismos não relacionados, particularmente na região carboxi-terminal da proteína;
- Os quadros de leitura apontados pela análise das sequências dos clones nem sempre indicam se os clones serão expressos devido aos frequentes erros de sequenciamento observados nas primeiras bases da sequência, ainda na região do vetor;
- A montagem do *cluster 70*cit foi feita com a superposição freqüente de 3 ou mais seqüências, garantindo a boa qualidade e uma baixa probabilidade de que as seqüências de aminoácidos possam estar erradas;
- Uma nova porção pode ser responsável por propriedades imunoestimulatórias, localizada a 5' do hexapeptídeo imunodominante EADDRA;

Capítulo II

- As regiões variáveis na seqüência de aminoácidos da HSP83 são candidatas a albergar um ou mais epitopos de linfócitos B e T;
- De um modo geral, as regiões divergentes estão mais distribuídas ao longo da molécula, entre membros da ordem Kinetoplastida e os não representantes da mesma;
- O padrão divergência/conservação tem um perfil mais especular entre a HSP83 de kinetoplastídeos e não kinetoplastídeos, do que o observado na HSP70;
- As ilhas de conservação são menos frequentes em HSP83 do que em HSP70;

Capítulo III

- O alto nível de representatividade dos genes reflete a forma peculiar como os tripanosomatídeos transcrevem seus genes;
- Os genes com função desconhecida chegam a 85%, promissores de alvos terapêuticos e profiláticos;
- Dos 161 clusters de *L. chagasi* analisados, agrupados em 18 categorias funcionais, 99 (61,5%) apresentaram similaridade com genes descritos para *Leishmania*; 31 (19,25%) com genes descritos para outros tripanosomatídeos; e 31 (19,25%) com genes descritos para organismos de outras espécies;
- Nove genes foram considerados restritos a tripanosomatídeos, dos quais dois codificam para proteínas de membrana, KMP-11 e META-1, relatados como antigênicas na literatura.

ANEXOS

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DAS REVISTAS:

- **MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY**
- **GENOME RESEARCH**
- **INTERNATIONAL JOURNAL FOR 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.

Submission Manuscripts in triplicate and including three collated sets of figures (one original set plus duplicate sets of the same quality) ready for the printer should be submitted to one of the editorial offices. 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 a increase in the total number of pages necessary for the presentation of the work.

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 WebIn: <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.

Instructions for authors regarding GenBank/DNA sequence linking

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: "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: "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 The preferred medium of final submission to the accepting editor is on disk with accompanying reviewed and revised manuscript (see *Electronic manuscripts* below). Manuscripts should be in English on numbered pages with double-spaced typing throughout (including tables, legends and reference lists) on one side of the paper only with margins of a least 3cm all round. 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, telefax 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. Maximum length is four printed pages, including one or two figures. 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 sheet 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 be submitted as black-and-white prints on glossy paper and 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. Figures 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>).

Electronic Manuscripts Electronic manuscripts have the advantage that there is no need for the rekeying of text, thereby avoiding the possibility of introducing errors and resulting in reliable and fast delivery of proofs. For the initial submission of manuscripts for consideration, hardcopies are sufficient. For the processing of accepted papers, electronic version are preferred. After *final acceptance*, your disk plus one, final and *exactly matching* printed version should be submitted together. Double density (DD) or high density (HD) diskettes (3.5 or 5 inch) are acceptable. It is important that the file saved is in the native format of the wordprocessor program used. Label the disk with the name of the computer and wordprocessing package used, your name, and the name of the file on the disk.

Author enquiries Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature of Elsevier's Author Gateway.

Full details of electronic submission and formats can be obtained from <http://authors.elsevier.com>.

Proofreading Proofs should be read carefully and returned by fax or airmail within 2 days of receipt. Corrections should be restricted to typesetting errors; no other alterations will be accepted. Addenda in proof will be printed only in exceptional cases, and only after approval by the editors.

Reprints The author will receive an order form with the proofs on which reprints above

the 25 free per contribution may be ordered.

Page charges There will be no page charges.

Editors

C.E. Clayton Zentrum für Molekulare Biologie, Universität Heidelberg, Im Neuerheimer 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

J.E. Donelson, Department of Biochemistry, 300D Eckstein Medical Research Building, University of Iowa, 500 Newton Road, Iowa City, IA 52242, USA; e-mail; john-donelson@uiowa.edu

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

Genome Research Instructions to Authors

GENOME RESEARCH welcomes high-quality research papers presenting novel data on the topics of gene discovery, comparative genome analyses, molecular and human evolution, informatics, genome structure and function, proteomics, technological innovations and applications, statistical and mathematical methods, cutting-edge genetic and physical mapping and DNA sequencing, systems biology and other reports that present data where sequence information is used to address biological concerns. New data in these areas are published as research papers in the form of articles and letters, or methods and resource reports that provide novel information on methodologies or resources that will be of interest to a broad readership. Complete data sets are presented electronically on the journal's web site where appropriate. The journal also publishes review articles, commentaries, perspectives, and Insight/Outlook articles. All submissions to the journal undergo an initial editorial review. Those selected by the Editor as suitable for the scope and aims of the journal are peer-reviewed.

Publication time from acceptance of manuscript is two months. For papers accepted subject to revision, only one revised version will be considered; it should be submitted within two months of the provisional acceptance.

The journal only accepts papers that present original research that has not been published previously. Submission to the journal implies that another journal or book is not currently considering the paper.

Data Release Policy for papers published in *Genome Research*

Researchers who submit papers to this journal are prepared to make available to researchers all materials needed to duplicate their work. Material from a publication must be easily available to the broader community in publicly held databases and repositories when available, and at the *Genome Research* web site, and if desired at the author's web site, when they are not. *Genome Research* will NOT consider manuscripts where data used in the paper is not freely available on either a publicly held website, or in the absence of such a website, on the *Genome Research* website. There are NO exceptions. (For details on websites for data submission see **Website Links** below.) Authors submitting papers whose main purpose is to describe or present a new computer program or algorithm should be prepared to make either the source code or a downloadable program freely available. Accession numbers for data should be available by the page proof stage. (Note, making material available is meant to be within reason, given the limited supply of some reagents etc..)

Genome Research encourages all data producers to make their data as freely accessible as possible prior to publication. Open data resources **accompanied by** fair use will serve to greatly enhance the scientific quality of work by the entire community and for society at large.

Fair Use and Acknowledgement of Data Resources

For acknowledging data obtained from publicly held databases, accession numbers for all such data must be included where appropriate in the text or tables of the manuscript, and the website should be placed in the text and in the Website References. For use of publicly held data, *Genome Research* follows the recent guidelines for fair use of community

resource data as detailed in the [recent publication produced from the Fort Lauderdale Meeting, 2003](#). Use of such data requires the material be cited with website and accession numbers as described above, and in cases where a large amount of unpublished information is used from one lab or center, authors should cite the laboratory or center that produced this information in conjunction with the publicly held site where the data were obtained. *Genome Research* encourages data users to embrace the spirit of the Fort Lauderdale, 2003, agreement by using this material in creative new ways rather than producing early and incomplete versions of the producers aims; the Editors will be considering material in this light.

When using data from a laboratory's or center's private website, the laboratory or center should be contacted for permission and the website should be placed in the text AND in the references, appropriately denoting it as a source of reference material for this work. Clones from centers must be cited by the names associated with the center's nomenclature, which is approved nomenclature.

In any instance where individuals have contributed more than just standard data release information, these individuals should be contacted, shown the manuscript, and their status on the paper (whether they prefer authorship or not) determined prior to submission.

Papers should be submitted to:

Laurie				Goodman
Executive				Editor
Genome				Research
Cold	Spring	Harbor	Laboratory	Press
One		Bungtown		Road

Cold Spring Harbor, NY 11724

e-mail: goodman@cshl.org

Tel: (516) 422-4012; Fax: (516) 422-4092

Online manuscript submission All papers can be submitted on by the author to our online manuscript submission system available at <http://submit.genome.org>, alternatively, the *Genome Research* editorial office will submit the manuscript on behalf of the authors, it is, however, faster for authors to submit their own work. If you do prefer to have the Genome Research office submit your manuscript for you, it is imperative that any manuscripts submitted by post must include 3 hardcopies of the manuscript text, tables and figures as well as an electronic version of the manuscript text and, preferably, as many figures and tables as possible in an electronic format. Files that **can** be used by the online system are: Word, WordPerfect, and PDF (Portable Document File). LaTeX currently can not be used by the system- please submit in a PDF format (and include the .tex file as your 'source' file). Image and Table file formats accepted are GIF, TIFF, EPS, PDF, and JPEG. (Please note: for accepted manuscripts, only .tif and .eps electronic formats can be used by the printer (see below for details on figure format for accepted manuscripts). For reviewing purposes all of the above are fine.) For tables, the system accepts most word processing formats as well; NOTE the system does not accept excel files at this time- please paste tables made in excel into a word document format; these can then be easily submitted. Supplemental files can be submitted in any format as these will be downloaded as needed, and will not be converted into a PDF with the text figures and tables.

PAGE numbers must be included on all pages, and Figure and Table numbers must be presented on the FRONT of the figures and tables when posted online, as which figure and

table is which may not be clear in the PDF version created for the reviewers unless a reference to figure or table number is on the FRONT.

Please note: **Files that CAN NOT be used by the online system** include: **Any Tex-type files** [convert to a PDF], **Excel (.xls)** [convert to Word], and **Bitmap (.bmp), PICT (.pict), photoshop (.psd), PowerPoint (.ppt), CorelDRAW (.cdr)** [convert all figure files to Word, GIF, TIFF, EPS, or JPEG. There is a graphics converter program available as shareware that can convert electronic figures to usable formats at <http://www.webattack.com/get/imagetransformer.shtml>. This program will NOT upgrade the quality of the image, but can convert file type to one that can be used by the online system and make your figures suitable for review purposes.

If you are having difficulty with the website, please submit your problem through the feedback button at the online submission site. If you have specific questions about your manuscript, please contact the editor via e-mail.

Manuscript preparation

Author signatures required.

All manuscript submissions to *Genome Research* must now include signatures from all all the authors on the manuscript indicating that they have read and approved the content of the work and agreed to its submission in its current format. Please mail or fax a letter or statement along with the required signatures confirming that all authors have reviewed the manuscript as soon as possible. Manuscripts submitted online, prior to our receipt of author signatures, will continue to be processed. Failure to provide this material if the work is

accepted, however, can result in a delay (or ultimately a decline on our part) to publish your manuscript.

Other material that needs to be sent to the Editorial office:

Manuscripts submitted ONLINE do not require anything to be sent to the editorial office besides the signatures of the authors, unless the editorial office specifically requests it. For manuscripts that are NOT submitted online, three copies of the manuscript must be submitted (computer printouts of the manuscript should be of letter quality, and each page should be labeled with the first author's name and a page number); at least two of these copies should have original art. A computer diskette (3-1/2", zip, or CD) containing a copy of the text of the manuscript and as many of the display items as possible MUST accompany all submissions, as this is necessary for the review process. DO NOT e-mail manuscripts to the editor or the editorial secretary to be posted online. We require a formal mailed submission if the work is to be submitted for consideration.

All related manuscripts in press, submitted, or in preparation MUST be disclosed. Additional supplemental files are encouraged as necessary for a thorough review process. These can be uploaded as supplementary information online or mailed to the office.

A cover letter should include:

(a) name, address, telephone number, FAX number, and e-mail address of author responsible for correspondence regarding the manuscript

(b) paragraph highlighting the main points of the work

(c) statement that the manuscript has been seen and approved by all listed authors

(including, or followed by, a mailed or faxed letter with signatures indicating approval

from all authors)

(d) a list of potential referees (we need the referees name and either Institution or e-mail (more information is always great), and if desired, a (reasonable) list of individuals with potential conflict, as we work very hard to avoid sending manuscripts to competitors
(e) any specific requirements for reproduction of art
(f) status of any statements of personal communication or other permissions needed (any data presented as unpublished results from individuals other than the authors require permission for use) and
(g) statement regarding databank submission of data.

The title page should include: the title, all authors names and institutions, the corresponding author's complete contact information, a running title (50 characters or less, including spaces), and at least two key words.

Manuscript Type: The general format for all manuscript types (Article, Letter, Methods, Resource) is identical (as described below). The selection of type is based on the content of the manuscript, and will ultimately be decided by the Editor. **Research:** ARTICLES generally contain extensive conceptual advances as well as extensive analyses with wide appeal for a variety of readers. LETTERS are the most common manuscript published in *Genome Research* and contain a solid advance of general interest to the our readers, but are likely of greatest interest to specific fields. **Methods and Resources:** METHODS are manuscripts where the primary focus is on a novel methodology; these manuscripts often contain extensive supportive biological data. RESOURCE reports present information on useful tools, databases, or large-scale informational resources, such as detailed maps or data sources, that hold broad appeal for the community at large and include novel biological information or technology.

General manuscript format: We prefer the manuscript be written in active rather than passive voice. Print only on ONE side of the page. Manuscript sections should be presented in the following order: title page, ABSTRACT (the abstract can be no more than 200 words. There should be a second paragraph (not counted in the 200 words) that indicates if there are going to be accession numbers (for all data types) and/or supplementary material; this second paragraph should also include a list of names of all individuals (not authors) who provided reagents, samples, any unpublished information or any other materials for this work), followed by INTRODUCTION, RESULTS, DISCUSSION, METHODS, ACKNOWLEDGMENTS, FIGURE LEGENDS, FIGURES, TABLES, REFERENCES, WEBSITE REFERENCES. Tables providing information (such as primers and sequences) that are essential for reproducing the work, but not essential for understanding the content of the paper should be included only as supplementary data. In addition extremely lengthy tables are best presented in complete form as online supplementary material. We recommend that authors with long tables e.g. more than one page at 6.5" X 9" with no smaller than 8 pt. type) create a sample single page table for inclusion in print (it should include anything discussed in the text) and include a copy (electronic) of the complete table for display as an online supplement. Some consideration for altered layout format (e.g. inclusion of extra long tables, or METHODS preceding RESULTS) for manuscripts will be taken into account for reports where an altered format aids in subject comprehension; altering the format should be discussed with the Editor. The methods should be detailed enough to allow any qualified researcher to duplicate the results. Additional material for reviewers can be included and marked as such (especially appreciated, when possible, are disks containing material from websites that need to be examined by referees as websites with passwords may compromise referee anonymity).

You **MUST** use approved nomenclature for protein and gene names (including appropriate use of italics (NOTE: using italics is a standard for genes, so put ALL gene symbols, loci, d-numbers etc. in italics) and capitalization as it applies for each organisms' standard nomenclature format, in text, tables, and figures To aid you in doing this, you will find links below to nomenclature sites for a variety of organisms). You must submit novel genes and proteins to the appropriate databases. Sequence data, SNP data, array data, molecular interaction data, and any other data where there is a publicly held database **MUST** be submitted to these databases. *Genome Research* will NOT consider manuscripts where data used in the paper is not freely available on either a publicly held website, or in the absence of such a website on the *Genome Research* website. There are **NO** exceptions. Novel gene and protein names must be approved prior to publication. For website links for data submission, or for nomenclature rules or for submission of gene or protein names, see **Website Links** below.)

Failure to use appropriate nomenclature for manuscripts that have been accepted can result in change fees at the time of manuscript processing.

References are of two types: Standard article and book references and website references.

Article and book references. Cite as (name date) in text, not by number. Undated citations (unpublished, in preparation, personal communication) should include first initials and last names of authors, e.g. (F. Smith pers. comm.) and do not appear in the reference list.

The reference list should be presented in alphabetical order. Note **ALL** authors names should be included when there are **TEN** names or less. If more than ten names, the reference should include the first **TEN** names, followed by et al.. Bibliographic information should be supplied in the following order.

For journal articles: Last name, first initial of up to ten authors. The year. Article title. *Journal title, abbrev.* **Volume:** First-last pages.

e.g. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of X-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350--1354.

For books: Last name, first initial of up to ten authors. The year. Chapter title, if used. *Book title.* (editors, if included) First-last pages. Publisher, city, state.

e.g. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Miller, J.H. 1972. Generalized transduction; use of P1 in strain construction. In *Experiments in molecular genetics* (ed. Miller, J.H.), pp. 201--205. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Website References: If the paper includes website URLs as references for places where material was obtained for doing the work, the URL should be included next to that information in the text, and an additional reference list, entitled "Web Site References" containing all websites cited in the paper should be placed after the article and book reference list. The format of the website reference list should be the URL followed by the author or the site and/or name of the site (if it has one).

e.g. <http://www.genome.org>, Genome Research Home page

Figures For online submission- be sure figures have figure number included on the front. If we are submitting your manuscript to the system for you, we prefer that electronic copies of

figures also be included with the manuscript (GIF, TIFF, EPS, or JPEG) to enable the staff to more easily put your manuscript into our online system, but this is not absolutely essential as we can scan the figures. Inclusion of electronic copies does, however, speed up the conversion process especially when large numbers of figures are included in a manuscript. All hardcopies of figures should be labeled with the first author's name, the figure number, and an indication of the top of the figure. (Electronic files for figures should be named with the first author's name and the figure number, for example Smith_Fig1. Also, be sure to include the figure number on the front of the figure in the file). If the manuscript is accepted for publication, the size of the figures will be adjusted to fit the journal format; therefore, please try to keep labels, symbols, and other call-out-devices (i.e., A, B, C, etc.) in proportion to the figure size and detail (Use Helvetica (or similar) typeface in point sizes no smaller than 8 pt and no larger than 10 pt, except for the main callouts (e.g. A, B, C, etc.), which should be 12 pt). NOTE ALSO: For publication purposes, file type and format are very stringent and ONLY the type of files described below under "Submission of Electronic Figures for Accepted Manuscripts: Detailed Instructions" below can be used. Any of the above formats can be used for reviewing purposes, but if the author wants us to use electronic figure files (which reproduce best), specific file formats must be provided. Authors wishing to publish color art must pay the associated publication costs; price estimates will be provided on acceptance of the paper. In cases where the authors can not cover color art fees, but it is clear the figure must be presented in color, such fees may be waived at the discretion of the Editor. A letter explaining the circumstances should be sent to the [Editor](#).

Accepted manuscripts

Paper length in the journal is between 2 and 12 journal pages. A manuscript of 28-32 typed, DOUBLE-SPACED pages with 27 lines of 11-point text per page (a manuscript of 63,000 characters) with 4-6 figures and 1 or 2 tables will translate to 12 printed pages in the journal. **Accepted manuscripts:** Hardcopy submission requires two copies of the manuscript and figures and an electronic version of the manuscript in a WORD format. For online submission, a Microsoft WORD source-file needs to be included in the submission, no hard copy of the manuscript text is required. Electronic versions of figures as TIFF or EPS files ONLY can be used at this stage. Details on electronic figure format requirements from our PRINTER are described below. We do require 2 hardcopies of all original artwork for sizing and also for any color matching required, regardless of the availability of electronic files.

We regret, we CAN NOT use electronic versions of manuscripts written in any Tex-related programs. In cases where manuscripts have been written in Tex-type programs, submit two hardcopies of the manuscript, (or submit a PDF (that is properly formatted as compared to the Tex version) to our online site). Provide a .txt version of the Tex file online or on disk. (That is a Tex file that does not have any of the coding embedded in the text. We are currently testing a new Tex to Word conversion system and hope to have this in place soon.

Proofs are considered the final form of the paper and corrections at this stage do incur charges, so changes should be kept to a minimum as much as possible. Making sure the details of formatting and nomenclature have been followed prior to final acceptance will greatly reduce the need for changes at this stage. If additional data or substantive changes to the text, figures or tables need to be made at this stage, it must be approved by the Editor.

To help defray the cost of publication, a charge of \$30 per page will be made for publication in *Genome Research*. Authors unable to meet these charges should include a letter of explanation upon acceptance for publication; inability to meet these charges will have no effect on acceptance and publication of submitted papers.

Submission of Electronic Figures for Accepted Manuscripts: Detailed Instructions

For our printer- electronic art files can only be in a TIFF or an EPS file. We also require two hardcopies of the files at the final acceptance stage to properly size and color match your figures. Detailed instructions for electronic artwork format are available below which may aid you in converting files to those suitable for processing by our printer. Artwork does not need to be supplied electronically, but this provides the best quality for both the print journal and especially for PDFs. Cover proposals must include an electronic version as a TIFF.

Please note we CAN NOT accept Canvas, PowerPoint, SuperPaint, Corel Draw, Harvard Graphics, PDFs, or Excel graphics because they are not compatible with our printer's output devices.

1. For final publication purposes, we can only accept your electronic art as an EPS or TIFF file. See specific instructions below on saving your files in the most common programs. (For reviewing purposes, other file types are okay, as outlined above under manuscript submission.)

2. AUTHORS **MUST PROVIDE A GOOD CAMERA-READY COPY QUALITY PRINT WITH THEIR ELECTRONIC FILE** for cases when electronic versions of the art fail, and as an additional check for the quality of the electronic version for publication. Always include a printout of the art at the same size it is saved on the disk. Do not enlarge or reduce the printout. This is important in case we cannot read your file and to make sure that what is on the disk is the same as what you provided. We will also be using this printout to size the artwork. If the art is in color, please provide a high quality color print so we can use your print as a guide for colors.

3. The artwork should be put on a zip disk or CD-ROM. We do not accept Syquest disks. Please make sure that your files are properly labeled by first author's name/figure number (for example, Smith_Fig1, Smith_Fig5) and that the printout is properly labeled and corresponds to the file name. Let us know the program you created your artwork in as well.

4. Send only FINAL electronic art files. Do not send text, such as figure legends, on the same disk with the art files. **DO NOT EMBED FIGURES WITHIN THE MANUSCRIPT TEXT FILES** or embed legends with the figures. If there are color keys to the figures, these should be included in the body of the figure rather than in the legend, as it can be difficult to match legend and figure colors.

5. Use Helvetica (or similar) typeface in point sizes no smaller than 8 pt and no larger than 10 pt, except for the main callouts (e.g. A, B, C), which should be 12 pt.

6. We cannot make any art corrections to TIFF or EPS files. All figures should be proof-read carefully before they are sent to us.

Electronic Artwork Requirements

All digital art *must* be created in either Illustrator or Photoshop and saved as an .eps or .tiff file. This applies to all art types listed below.

Line **Art**

Line art (without halftone dots) should be scanned or produced at a minimum of 1200 dpi in bitmap mode.

Halftone **or** **Grayscale** **Art**

Art to be reproduced as halftones should be scanned or produced at 350 dpi in grayscale mode. This is for halftone/grayscale art only (art that doesn't also have line art within it). If within the halftone artwork there also exists line art, please follow the dpi specifications for Combo Art instead. When in doubt with halftone art, always default to the Combo Art specifications to ensure that halftone digital art will be used.

Combo **Art**

Combo art, which means both halftone art and line art within the same piece of art, must be 900 dpi in grayscale mode.

Color **Art**

Color art to be reproduced as halftones should be scanned or produced at 350 dpi in CMYK mode. Always save your color scans into the CMYK color space. **Never submit color electronic files in the RGB mode.** When color files are converted from RGB into CMYK the color can change significantly and type can be lost. Please convert any RGB files to CMYK files prior to submitting such artwork to make sure the file is correct. Also, make sure not to choose the ICC selection; CMYK must be selected in all color art files. (If files

are submitted with ICC selected, colors often change when ICC is clicked off and changed to CMYK instead, which is why ICC files are *not* accepted.

Why electronic art file submission has so many restrictions:

Cold Spring Harbor Laboratory Press makes every effort to use the electronic files from the authors. We are well equipped and trained with many of the graphics software programs that are used in the scientific community. Adobe Illustrator, Adobe Photoshop, and Freehand are the main "true" graphics programs that all publishers and printing industries support. The file formats from these programs are universal and can easily be read by high-end imagesetters. Canvas, Corel Draw, Powerpoint, Harvard Graphics, and SuperPaint are typical graphics programs that excel at creating visual presentations, slides, and overheads. They may print well to a laser printer and look great on the computer screen (from within their own application format), but they do not always export in file formats that can be printed through high-end imagesetters.

The printer uses the electronic files to output film off of their high-end imagesetters. Graphics created from Canvas, for example, can sometimes lose text or the screens may fill in as solids when outputting film from these high-end imagesetters. Canvas does not actually create screens, as Illustrator and Photoshop do. Canvas creates patterns to simulate screens and this can cause problems on press. Also, printers print in CMYK. Most authors submit their files in RGB. When we convert these files to printing industry standards, the colors often change completely. This is why it is very important for the artwork to be created as CMYK and for us to have a printout of your artwork. If we do not have at least a laser printout of your artwork, we will not know if type has been lost. A good quality print

is preferable, because we will be able to make sure that the color and data have not changed. Also, in the event that we cannot use your file, we will be able to shoot film from this print.

We understand the frustration authors have when publishers say they cannot use their files when everything looks fine on the computer screen and prints well to the laser printer. Please understand that publishers want to use the files, but these files **MUST** comply with printing industry standards. The problem arises when we have to take these files and transfer them into a file format that a printer can use. Illustrator, Photoshop, and Freehand support the printing industry standards. We hope the other graphics programs will eventually support printing industry standards as well.

International Journal for Parasitology

print page

close window

Guide

for

Authors

Submission. Submission of a manuscript implies that it has not been published previously, and if accepted in the *International Journal for Parasitology* will not be published elsewhere without the approval of the Editor-in-Chief. To aid the refereeing process, one copy of all papers referred as "in press" should accompany the submission. **There are no page or submission charges. Twenty five free reprints will be provided.** Prospective authors have their choice of Electronic or Hard Copy submission. Authors should choose the method of submission best for them, BUT only one method must be used i.e. do NOT follow up an electronic submission with a hard copy submission.

Electronic Submission: Electronic submissions should be sent to:
IJP@vetp.usyd.edu.au

Preferred formats include Microsoft Office programs, pdf, jpg, tif and gif, but if you intend to use another format, contact the Editorial Office to confirm that it is acceptable. The electronic submission should be followed by a Fax or letter signed by all authors confirming that each has read the manuscript and accepts responsibility for its contents. Review will be commenced before

this arrives, but papers will not be published without it. Authors are also requested to provide a facsimile number and E-mail address to facilitate communication.

Hard copy submission: Hard copy manuscripts should be sent to:

Associate Professor Nicholas Sangster
Editor-in-Chief, *International Journal for Parasitology*
Faculty of Veterinary Science
Building B14
University of Sydney NSW 2006, Australia
Fax: +61 (0) 2 9036 9485

E-mail: IJP@vetp.usyd.edu.au

Three copies of both text and figures, not larger than A4 size, should be provided. The manuscript should be accompanied by a letter signed by all authors confirming that each has read the manuscript and accepts responsibility for its contents. Authors are also requested to provide a facsimile number and E-mail address to facilitate communication.

General. The journal publishes the results of high quality original research in all aspects of basic and applied parasitology, including all the fields covered by its Specialist Editors, and ranging from parasites and host-parasite relationships of intrinsic biological interest to those of social and economic importance in human and veterinary medicine and agriculture. Original research includes the development of new concepts and techniques, as well as experimental and observational science. Because of its breadth of

discipline coverage, the aims and significance of all contributions should be made clear to readers who are not expert in the particular subject of papers. In applied parasitology, it will tend to favour contributions of broader significance to the subject rather than narrow, highly specialised applications.

Typescript. Papers should be typewritten in English on A4 paper, in double-spacing, and with wide margins including a left-hand margin of not less than 2 cm.

Title page. In addition to the title, this should give the names and addresses of the authors, and the name and address and a facsimile number and e-mail address of the author to whom correspondence and proofs should be sent.

Abstract. The second page should consist only of an Abstract of not more than 300 words without paragraphs. At the foot of this page a list of up to 6 Key Words should be provided.

Text. For original papers, the remainder of the manuscript should generally be written under the following main headings: Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; Tables; Legends to Figures. Main headings should be numbered, bold, in capitals and lower case, flush left and not underlined. Two forms of subheadings are used: (a) the italicised side subheading referring to several paragraphs; (b) the italicised paragraph subheading at the beginning of a single paragraph used only in Materials and Methods.

Acknowledgements. Authors should provide confirmation of consent from persons acknowledged in manuscripts, where the acknowledgement could be taken to imply support for the scientific content of the submitted manuscript.

References. Correct references are the responsibility of the author.

Please ensure that all references cited in the text are included in the reference list.

References in the text start with the name of the author(s), followed by the publication date in brackets, e.g.: 'Rossi (1985) has shown the importance of....', or '.....has been described (Rossi, 1985; Brown et al..., 1986)', using date order.

More than one paper from the same author in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc., placed after the year of publication. In the text, when referring to a work by two authors, use (Brown and Rossi, 1992) or for more than two authors, the name of the first author should be given followed by et al.

The references in the reference list should be in alphabetical order and typed double-spaced on sheets separate from the text. References to journals should contain names and initials of all author(s), year of publication, article title, abbreviation of the name of the journal according to the *List of Serial Title Word Abbreviations* (International Serials Data System, 20, rue Bachaumont, 75002 Paris, France. ISBN 2-904938-02-8), volume number and page numbers. 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. References to books should also include the title (of series and volume), initials and names of the editor(s) and publisher and place of publication.

Examples:

Dame, J.B., Reddy, G.R., Yowell, C.A., Dunn, B.M., Kay, J., Berry, C.:, 1994. Sequence, expression and modeled structure of an aspartic proteinase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. 64, 177-190.

Katz, M., Despommier, D.D., Gwadz, R.W., 1989. Parasitic Diseases. Springer-Verlag, Berlin.

Lattemann, C.T., Apfel, H., in press. PCR-based amplification of total cDNA with high fidelity and high yield from minute amounts of parasite RNA. Int. J. Parasitol.

Worthington, J., Morgan, K., 1994. Epitope mapping using synthetic peptides. In: Wisdom, G.B. (Ed.), Peptide Antigens. IRL Press, Oxford, pp. 181-217.

Tables. These should be self-explanatory, each typed on a separate page with its title at the top, numbered consecutively and with its position indicated in the text. There should be no vertical lines in tables. Abbreviations if used at all, should be explained as footnotes identified by

small superscript alphabetical characters.

Abbreviations. Avoid the use of abbreviations, but if necessary, authors should use the list printed at the end of these Instructions as a guide to those terms which need not be given in full.

Figures. Illustrations of all kinds should be listed together under "Legend to Figures" numbered consecutively and their positions indicated in the text. For refereeing purposes, three good quality reproductions of each figure should be provided, photocopies of photographs are not acceptable. Figures should be of an adequate size to ensure clarity, and letters and numbers should be at least 4 mm in height. Each photograph should have on the back a clear indication of the top of the figure and near the top edge, the author's name and the figure number. Magnification should be indicated by inclusion of a scale bar in the figure and its value should be indicated on the figure or in the legend.

Submission of sequence data to databases. 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 the World Wide Web to either GenBank (via BankIt: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>), EMBL (via WebIn: <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: gb-sub@ncbi.nlm.nih.gov; enquiries: info@ncbi.nlm.nih.gov), EMBL (submissions: datasubs@ebi.ac.uk; enquiries: datalib@ebi.ac.uk) or DDBJ (submissions: ddbjsub@ddbj.nig.ac.jp; enquiries: sakura-admin@ddbj.nig.ac.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.

.Instructions for authors regarding GenBank/DNA sequence linking

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: "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: "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)".

Taxonomic publications. Taxonomic papers should be of broad interest, going beyond purely morphological descriptions which are best suited to specialist journals. Examples of contributions of broader interest include description of new taxa which do not fit within accepted classifications, analyses which are of phylogenetic or biogeographic significance employing techniques in addition to morphology, or which include information on host-parasite relationships or deleterious effects on the host. Presentations which include description of new species should conform to a prescribed pattern as follows: where the new species name is written for the first time, "n.sp." should succeed it. The name should be followed by: (1) a description, in telegraphic style, i.e. without articles and verbs, providing an overall statement of the specific characters; the description must be accompanied by illustrations depicting the main differentiating characters; (2) a diagnosis, emphasising the characters of the new species or genus; (3) the details of type material, i.e. host, location in host, geographic locality, collector, place

of deposition and registration which must be cited. Synopses (a brief summary of a small taxonomic group of parasites) and checklists (a list of parasites from particular hosts in particular localities) are acceptable, provided species named are critically evaluated and identifications are sound. Specimens upon which new host or locality records are based must be deposited in a museum or recognised collection to be available for further study and registration numbers must be cited. Names, authors and years of publication of original descriptions of named species should be cited in the text in the manner recommended by the International Code of Zoological Nomenclature.

Care of experimental animals. Many countries and organisations have legislation and guidelines for the care and use of animals for research purposes and it is the responsibility of authors to ensure that their practices conform with those relevant to them. Nevertheless, submitted papers must contain precise details on the care and use of animals and of experimental procedures, especially surgical procedures, anaesthesia, blocking agents, blood and tissue sampling, and methods of euthanasia. Referees are asked to indicate whether there is any reason to consider that experimental animals were not well treated or care not taken to avoid distress, and papers may ultimately be rejected on such grounds.

Proofs. Page proofs for correction will be e-mailed to the author in pdf format by the Publisher. **It is the responsibility of the author to ensure that the proof contains no errors and are sent back within 48 hours**

of receipt. Authors should not correct changes which may have been made by the Editor-in-Chief or the Publisher to conform with required presentation, but may refer to them in an accompanying letter to the Production Editor. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.

Rapid Communications. This section is to enable particularly rapid publication of highly significant findings. The letter accompanying the manuscript must contain an explanation as to why the work is of such significance to justify publication as a Rapid Communication. Authors are encouraged to contact the Editor-in-Chief prior to submission to see if their paper merits rapid publication. All stages of processing and assessment will be carried out without delay and articles accepted will be published in the first available issue. Articles will be limited to about six journal pages including figures, tables and references, with a limit of 4000 words and not more than four display items (figures or tables). The article must not be preliminary but will describe significant and substantial new findings, be complete in itself and not be published at a later date in greater detail. The final decision taken by the Editor-in-Chief on the advice of Specialist Editors and Referees will be influenced not only by scientific assessment but also by considerations of priority and suitability for this section of the Journal. The typescript should be marked "*RAPID COMMUNICATION*" on the top left-hand

corner of the title page. The first page should show the title of the paper, names and addresses of the authors, telephone and fax numbers and e-mail address for the corresponding author, a statement of the number of words in the full text, followed by a short Abstract of not more than 100 words in the same style as for full papers. The text of the paper should follow, written with a minimum number of paragraphs and no headings. Not more than 20 essential references should be given. Other instructions are the same as those for full papers. Page proofs will be faxed to the corresponding author and should be returned **within 48 hours of receipt** to the above address.

Letters to the Editor. Anyone wishing to comment on any topic of parasitological interest is invited to write directly to the Editor-in-Chief, Associate Professor Nicholas Sangster.

Submission on Disk. Authors are strongly encouraged to provide a computer disk (3.5" HD/DD disk) containing the final version of the paper along with the final revised manuscript when invited to submit this by the Editor-in-Chief. Disks should not be sent before this stage. Disks must be clearly marked with the following information:

- operating system
- disk format
- word processor used, including version number
- authors' names
- short title of article

Please also send a laser print of the artwork with the electronic file. We will accept any of the popular drawing programs for the Macintosh and PC.

Please note that in the event of differences between disc and hard-copy, the hard-copy will be considered as the definitive version. A disk should not be sent when the manuscript is first submitted.

Author enquiries.For enquires relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit the Author Gateway from Elsevier Science at [Author Gateway](#).

The Author Gateway also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an articles status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after the acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication.

[Abbreviationslist](#)

