



Caracterização in silico da gp63 de *Leishmania amazonensis*.

In silico characterization of the Leishmania amazonensis gp63



Submetido em 17.04.15 | Aceito em 19.05.15 | Disponível on-line em 20.09.17

Paulo Henrique Matayoshi Calixto*

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina | *phcalixto@gmx.com

Fabio Rodrigues Trindade, Anapaula Martins Mendes

Universidade Federal do Amapá

Leonardo da Rocha Sousa, Josemar José da Silva Júnior

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí

RESUMO

A gp63 é um dos principais fatores de virulência em *Leishmania*. É responsável por auxiliar a sobrevivência, nutrição e replicação do parasito. O objetivo deste trabalho foi gerar e caracterizar a estrutura tridimensional da gp63 de *L. amazonensis* (Lagp63). A geração do modelo estrutural foi realizado por modelagem comparativa, empregando o programa Modeller, a partir da sequência de aminoácidos da Lagp63 depositada no GenBank. Os resultados obtidos apontaram que a Lagp63 possui todos os elementos necessários para o processamento pós-traducional e de funcionamento. A estrutura da Lagp63 apresentou as mesmas características estruturais da proteína molde, gp63 de *Leishmania major* (Lmgp63). O alinhamento entre as estruturas de Lagp63 e Lmgp63 revelou grande conservação estrutural, sobretudo das regiões onde está localizado o sítio catalítico. O estudo das cargas parciais aponta a mesma distribuição das cargas de superfície, indicando que ambas as proteínas possam clivar os mesmos substratos. Por fim, a dinâmica molecular apontou que a Lagp63 é estável, tanto do ponto de vista estrutural, quanto de compacidade. De acordo com os resultados, sugerimos que a Lagp63 seja um excelente alvo para o tratamento profilático e/ou curativo da LTA, através do desenho racional de fármacos baseado na estrutura gerada.

Palavras-chaves: gp63; modelagem comparativa; dinâmica molecular; *Leishmania amazonensis*.

ABSTRACT

The gp63 is a major virulence factors in *Leishmania*, is responsible for assisting in the survival, nutrition, and parasite replication. The objective of this study was to generate and characterize the three-dimensional structure of *L. amazonensis* gp63 (Lagp63). The generation of the structural model was performed by comparative modeling, using the program Modeller from the amino acid sequence Lagp63 deposited in GenBank. The results showed that the Lagp63 has all the elements necessary for the post-translational processing and functionality. The structure of Lagp63, showed the same structural characteristics of the template-protein, *Leishmania major* gp63 (Lmgp63). The alignment between the structures Lagp63 and Lmgp63 revealed great structural conservation, especially the regions where is located the catalytic site. The study of the partial charges shows the same distribution of surface charges, indicating that both proteins can cleave the same substrates. Finally, molecular dynamics showed that Lagp63 is structurally stable. According to the results suggest that Lagp63 is an excellent target for the prophylactic and/or curative treatment of American tegumentary leishmaniasis, through rational drug design based on structure generated.

Keywords: : gp63; comparative modeling; molecular dynamics; *Leishmania amazonensis*.

1. Introdução

A leishmaniose é uma doença parasitária, de ampla distribuição geográfica, provocada por espécies do *Leishmania* spp. A leishmaniose é encontrada em 88 países de climas tropical e subtropical. No Brasil, são registrados 26 mil novos casos de leishmaniose a cada ano, sendo a maioria deles atribuídos à *Leishmania braziliensis* e, em menor proporção, à *Leishmania amazonensis*, agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar americana (LTA) (WHO, 2010; ALVAR *et al.*, 2012).

A LTA provocada pela *L. amazonensis* apresenta ampla variedade de manifestações clínicas, variando desde o surgimento de lesões únicas e auto-limitadas, como é o caso da leishmaniose cutânea localizada (LCL), até formas mais graves e disseminadas, tais como a leishmaniose cutânea difusa (LCD) (BARCINSKI *et al.*, 1992; BALESTIERI *et al.*, 2002). Essas diferenças clínicas dependem principalmente das características moleculares do parasito, bem como, da resposta imune do hospedeiro (CONVIT *et al.*, 1993). Enquanto o curso da LCL é bem conhecido, as bases moleculares que determinam a patogênese da LCD ainda não foram totalmente determinadas. A LCD é uma manifestação clínica rara e se caracteriza pelo surgimento de várias lesões nodulares não-ulceradas na pele, incontrolada proliferação parasitária, resistência à maioria das estratégias terapêuticas e ausência ou redução da resposta imune celular contra o parasito (CONVIT *et al.*, 1993; BALESTIERI *et al.*, 2002). A maneira na qual a *L. amazonensis* interage com o hospedeiro e influencia o quadro clínico da infecção, reflete a refinada relação parasito/hospedeiro estabelecida entre eles.

A interação da *Leishmania* com seus hospedeiros é multifatorial. Contudo, as moléculas de superfície desempenham papel de

destaque nessa relação. Uma dessas moléculas é a gp63, uma metaloprotease zinco-dependente, inicialmente descrita no gênero *Leishmania* como uma glicoproteína de 63 kDa. A gp63 pode estar associada à membrana através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (ETGES *et al.*, 1986) ou se apresentar na forma secretada, ou seja, sem sinal de adição de âncora GPI (McGWIRE *et al.*, 2002). O sítio catalítico da gp63 é composto pelo *motif* HEXXH coordenado ao zinco (SCHLAGENHAUF *et al.*, 1998). A gp63 desempenha diversas funções em *Leishmania*, tais como: interação com o sistema imune do hospedeiro, seja da resposta celular ou humoral; manutenção do vacúolo parasitóforo; interação com componentes intracelulares do hospedeiro, tais como mTOR (*mammalian target of rapamycin*); entre outras (HEY *et al.*, 1994; JARAMILLO *et al.*, 2011). Mesmo desempenhando um papel importante na interação parasito/hospedeiro, a gp63 de *L. amazonensis* (Lagp63) ainda é pouco estudada e caracterizações, tais como, estruturais ainda não foram realizadas.

Uma vez que a caracterização de uma proteína é melhor conduzida de posse da estrutura tridimensional, o objetivo deste trabalho foi gerar e caracterizar, por meio de ensaios *in silico*, a estrutura tridimensional da proteína em questão. Tais informações poderão ajudar no entendimento da interação da *L. amazonensis* com o hospedeiro vertebrado, bem como, fornecer perspectivas como base para a elaboração de ações de controle e/ou eliminação do parasito.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Recuperação de seqüências e estruturas

As seqüências de aminoácidos da gp63 utilizadas neste trabalho foram recuperadas a partir do *GenBank* e apresentam os seguintes números de acesso: *L. amazonensis* (Q27673), *L.*

major (P08148), *L. guyanensis* (AAA29242) e *L. braziliensis* (XP_001562828). A estrutura molde foi recuperada a partir do *Protein Data Bank* (PDB), registrada sob o código de acesso 1LML.

2.2 Análises computacionais de predição e comparação

A busca de elementos *cis* envolvidos no processamento pós-traducional e de comparação da Lagp63 com gp63 de outras espécies, foi realizada usando as seguintes ferramentas: a) SignalP (BENDTSEN *et al.*, 2004) para a identificação do peptídeo sinal; b) PredGPI (PIERLEONI *et al.*, 2008) para a predição do sítio de adição da âncora GPI; c) ClustalW (LARKIN *et al.*, 2007) para o alinhamento de sequências de aminoácidos.

2.3 Geração da estrutura terciária e análises computacionais complementares

Neste estudo, utilizamos a sequência da Lagp63 recuperada do GenBank (Q27673). O alinhamento de sequências foi gerado pelo programa ClustalW2 (LARKIN *et al.*, 2007) em modo *default*. Já a predição da estrutura secundária foi realizada através do *software* PSIPRED (BRYSON *et al.*, 2005).

A estrutura terciária da Lagp63 não foi experimentalmente determinada. Desse modo, a determinação da estrutura terciária foi realizada por modelagem comparativa. A fim de escolher a melhor estrutura molde, com cobertura e percentual de identidade satisfatórios, foram realizadas pesquisas via BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). O alinhamento entre a Lagp63 e a proteína molde foi realizado pelo programa Promals3D (PEI *et al.*, 2008) e manualmente acurado com o suporte do DNATagger, uma ferramenta *online* de visualização de sequências. O programa Modeller

(9.10v) (SALI; BLUNDEL, 1993) foi usado para gerar inicialmente 100 estruturas candidatas para a Lagp63, sendo a que apresentou os melhores parâmetros, incluindo os estereoquímicos, foi selecionada para este trabalho. Tendo em vista que a estrutura molde possui os heteroátomos zinco e moléculas de água associadas, estas foram adicionadas manualmente ao arquivo .pdb da Lagp63 recém-modelada.

O refinamento da estrutura foi conduzido através da predição dos rotâmeros e minimização da energia. A minimização foi realizada empregando o campo de força OPLS 2005 (*Optimized Potentials for Liquid Simulations*) em 5.000 passos de iteração.

O processo de validação estrutural compreendeu os seguintes níveis: a) avaliação dos parâmetros estereoquímicos, empregando o *software* Procheck (LASKOWSKI *et al.*, 1993); b) avaliação da qualidade geral da estrutura, alcançado pelo uso do programa ProSa (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

Estudos de alinhamentos estruturais, bem como a visualização do modelo, foram realizados empregando o programa Chimera UCSF. Já a determinação da superfície topológica e das cargas parciais de superfície foi realizada através do programa Molegro Molecular Viewer.

2.4 Dinâmica Molecular

A dinâmica molecular foi realizada com o auxílio do *software* GROMACS 4.6.6 (VANDER-SPOEL, *et al.*, 2005), instalado em precisão dupla. A estrutura da Lagp63 foi centralizada no *box* de simulação dodecaédrico, respeitando a distância de 1 nm das bordas. Posteriormente, o sistema foi solvatado, através da adição de água no *box*. O modelo de água empregado foi o SPC (do inglês, *Single Point Charge*). A neutralidade do sistema foi alcançada através da adição de átomos de cloro e/ou sódio, em quantidades para

que esses íons atinjam a concentração de 0,001 mol/L. A energia do sistema foi minimizada, sem restrições, através do campo de força OPLS-AA/L (do inglês, *Optimized Potentials for Liquid Simulations*).

A equilíbrio do sistema foi realizada em duas fases. A primeira fase, referente à estabilização da temperatura, foi conduzida sob um *ensemble* NVT (do inglês, *constant Number of particles, Volume, and Temperature*) e consistiu da simulação de 300 ps com flexibilidade restrita (-DPOSRES). A temperatura foi mantida constante a 300 K, através do tratamento termostático de Berendsen, com passo de integração de 2 fs. O tratamento das forças de Coulomb foi realizado com o esquema PME (do inglês, *Particle Mesh Ewald*), com *cut-off* de 1 nm. A frequência de anotação da trajetória e da velocidade nos arquivos foi de 2 ps. A segunda fase foi conduzida pelo *ensemble* NPT (do inglês, *Number of particles, Pressure, and Temperature*), e visou a estabilização da pressão do sistema. O *ensemble* NPT apresenta os mesmos parâmetros usados em NVT, exceto pela adição do barostato de Parrinello-Rahman e pela regulação da pressão para 1 atm (atmosfera). Após a equilíbrio, foi realizada a dinâmica molecular, com tempo de simulação de 5 ns.

2.5 Hardware

Este trabalho foi conduzido em duas máquinas não paralelizadas. A configuração da primeira máquina é a seguinte: processador Intel® Core™ i7-4790, 32Gb de memória RAM (1600 MHz), HD de 1Tb e GPU VGA GigaByte GeForce GTX660 Ti 2048MB, com sistema operacional Red Hat Linux. Já a segunda máquina, utilizada como suporte, possui o processador FX-8350, 8Gb de memória RAM (1600 MHz), disco rígido de 1Tb de armazenamento e GPU VGA GigaByte GeForce

GTX660 Ti 2048MB, com sistema operacional Linux, distribuição Ubuntu 12.04.

3. Resultados e Discussão

3.1 Análises da sequência de aminoácidos da Lagp63

Uma vez que a Lagp63 é uma enzima extracelular, o primeiro elemento *cis* a ser buscado foi o peptídeo sinal (PS). O *software* SignalP 3.0, indicou os resíduos N-MSVDSSSTHRHRCVAARLVPLAAGA-C como PS, com clivagem entre os resíduos Ala26 e Ala27 (Fig. 1). O PS é uma série de resíduos hidrofóbicos localizado na extremidade amino-terminal da proteína. Este é reconhecido pelo retículo endoplasmático rugoso, imediatamente após a síntese proteica, e translocado para o meio extracelular (BENDTSEN *et al.*, 2004). A gp63 é uma molécula de ação extracelular e localiza-se predominantemente na membrana citoplasmática. Nesse sentido, o segundo elemento *cis* a ser investigado foi a presença do sinal de adição da âncora GPI. Para tal, foi utilizado o *software* big-PI Predictor, que apontou o resíduo Asn574 (Fig. 1) como o sítio-ômega. Esse sítio é o local de adição da âncora GPI, sendo os resíduos *downstream* a Asn574 clivados da proteína (PIERLEONI *et al.*, 2008). Membros da classe das Metzincinas apresentam um mecanismo não usual para o controle da atividade enzimática no ambiente intracelular, esse mecanismo é conhecido como *cysteine switch* (GOMIS-RUTH, 2003). Para identificar os aminoácidos envolvidos nesse processo, foi realizado um alinhamento entre os resíduos da Lmgp63 e Lagp63. Os resultados apontaram os aminoácidos de Ala27 a Asn98, com destaque para Cys48 (Fig. 1), como participantes do *cysteine switch*; esse trecho de aminoácidos também é referido como propeptídeo. Membros

da família das Metzincinas são hidrolases que apresentam ampla gama de substratos. Dessa forma, caso estejam ativas no interior das células, essas enzimas poderiam digerir diversos componentes intracelulares. O *cysteine switch* confere a inatividade enzimática, através de um

resíduo de cisteína, no caso deste estudo a Cys48, projetado no interior da fenda catalítica. Consequentemente, enxofre, presente na cadeia lateral da cisteína, atuará como quelante do íon zinco, impedindo o processo hidrolítico. (GOMIS-RUTH, 2003)

Figura 1. Modificações pós-traducionais da Lagp63. A seta, linha e linha tracejada correspondem ao peptídeo sinal, propeptídeo e peptídeos clivados na adição da âncora GPI, respectivamente. As barras verticais em vermelho representam sítios de clivagem. O triângulo representa a cisteína envolvida no mecanismo de *cysteine switch*; já o círculo corresponde ao sítio ômega. Os resíduos contidos no box azul correspondem aos aminoácidos envolvidos na composição do sítio catalítico da Lagp63.

```

MSVDSSTTHRRHRCVAARLVPLAAAGAVTTVAVGTAATAAHAGAVQHRCTIHDAMQARVRQSVAAQRMAPSA
VSAVGLPHVTLDAAGNTAAGADPSTGTANVVRAANW GALRIAVSAEDLTDPAVYH CARVGGQ RVNNHVGDIVT
CTAEDILTDEKRDILVKHLVPQALQLHRERLKVQQVQ GKWKVTGHTADVCRYFKVPPAHVTGGVTNTDFV
LYVASVPSEESVLAWATTTCQVFADGHPAVGVINIPAANIA SRYDQLVTRVVAHEMAHALGFSGTFDFRVG
IVQKVPDVRGKPYFTPMINSSTAVAKAREQYGCNSLEYLEHEDQGSAAPGSHIKANAQDELMAPTASAGY
YTALTMAVFQDLGFYQADFSKAEAMPWGRNAACAF LSEKCHANGITKWPAMFCNESADAIRCPT SRLGVG
MCDVTPYQALPPYLQYFTDPFLAGSSAFMDYCPVVVPYADGSCAQSSASEADA AFKAFNVFSDAAACIDGA
FRPKTTHTGLIKSYAALCANVKCDTAARTYSVQVRGSSGYANCTPGLRFDLSTVSDAFEKGGYVTCPPYVE
VCQGNAQAIKDGGAAGRRGPRAATALVVAALLAVA

```

A investigação da conservação entre a sequência de aminoácidos de Lagp63 e outras gp63 foi realizada através de alinhamento global (Fig. 2). O alinhamento revelou grande conservação entre as gp63 de diferentes espécies. Além disso, a conservação de alguns resíduos, tais como cisteínas e prolínas, indicam compartilhamento de características estruturais.

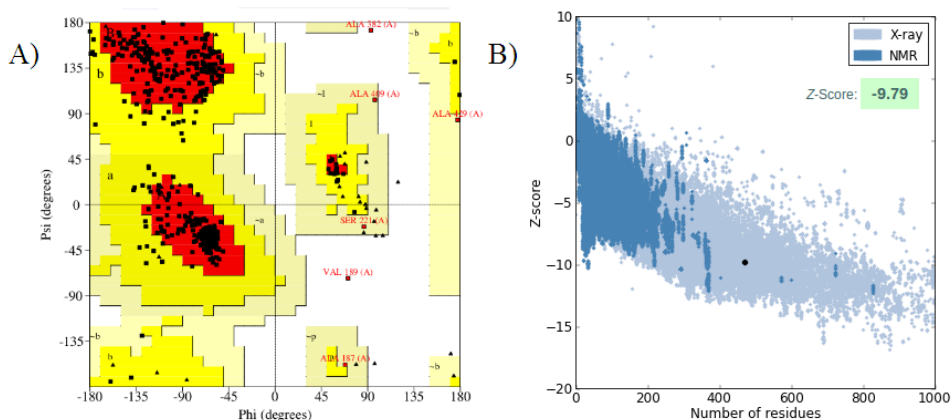
Esses resíduos são grandes influenciadores da estrutura terciária da proteína, a cisteína pela possibilidade de formação de pontes dissulfeto com outra cisteína, enquanto que a prolina apresenta cadeia lateral extremamente rígida, devido sua conformação cíclica (SCHLAGENHAUF et al., 1998; YAO et al, 2003).

mesma deverá apresentar o menor percentual de impedimentos

estereoquímicos possível. No caso da Lagp63 apenas dois resíduos (Val189 e Ala382), equivalente a 0,5% do total de aminoácidos da proteína, apresentam impedimentos estereoquímicos, segundo o gráfico de

Ramachandran. Além disso, ao ser analisado pelo ProSa, a estrutura deverá apresentar o valor do *Z-score* no intervalo permitido para os diferentes comprimentos de proteínas (LASKOWSKI *et al.*, 1993; WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

Figura 3. Validação estrutural da Lagp63. A) Representação de todos os aminoácidos no gráfico de Ramachandran. Os triângulos representam os resíduos de Glicina e devido às particularidades da cadeia lateral, não é capaz de apresentar impedimentos estereoquímicos. B) Resultado do ProSa e o valor do *Z-score*.



3.3 Estrutura geral da Lagp63

Uma vez validada, procedeu-se a caracterização proteica (Fig. 4). Estruturalmente, a Lagp63 é uma proteína compacta e dividida em três regiões: amino-terminal, central e carboxi-terminal. A região amino-terminal compreende os aminoácidos Val99 a Leu269 e apresenta perfil de enovelamento semelhante ao módulo catalítico de outras enzimas zinco-dependentes. Também nessa região, se localizam os resíduos que compõem o sítio catalítico HEXXH (His263, Glu264 e His267), sendo o fragmento peptídico de assinatura das proteases zinco-dependentes (GOMIS-RUTH, 2003).

A região central compreende os aminoácidos Gly270 a Ser387 e apresenta um perfil de enovelamento compacto com α -hélices anti-paralelas e fitas- β anti-paralelas, formando o cerne dessa região. Uma única ponte dissulfeto é responsável por ligar as regiões central e carboxi-terminal. Integrantes da família das Metzincinas possuem um *motif* catalítico estendido HEXXHXXGXXH, onde a glicina faz parte de uma pequena alça que projeta a terceira histidina dentro do sítio catalítico, colocando sua cadeia lateral em coordenação com o átomo de zinco. Interessantemente, a Lagp63 apresenta uma inserção de 61 aminoácidos entre a glicina Gly270 do *motif* estendido e a His332, que também se coordena ao zinco. Essa inserção está presente em

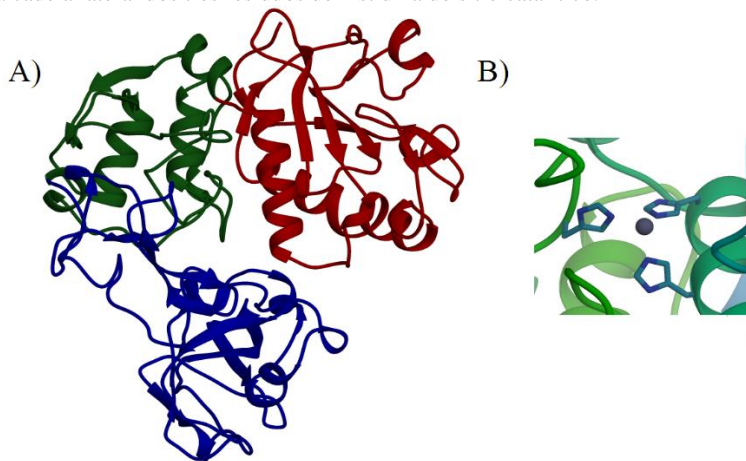
todos os membros do grupo das leishmanolisinas (SCHLAGENHAUF *et al.*, 1998; GOMIS-RUTH, 2003; RAZZAZAN *et al.*, 2008; CALIXTO *et al.*, 2014).

His263, His267 e His332 em distâncias de 2.3Å, 2.2Å e 2.2Å, respectivamente. Em adição aos três resíduos de histidina no sítio catalítico, existe uma molécula de água coordenada ao zinco. Esta molécula de água está localizada próxima ao átomo de zinco e é o nucleófilo responsável por atacar o substrato, no mecanismo de hidrólise. Ainda no sítio ativo da Lagp63, o átomo de zinco parece estar coordenado com a cadeia lateral do Glu264, em

A disposição das cadeias laterais dos aminoácidos que se coordenam ao zinco é similar ao das outras zinco-proteases. O átomo de zinco está coordenado às cadeias laterais da uma distância de 1.8Å, de forma semelhante a descrita em trabalhos anteriores (CALIXTO *et al.*, 2013).

A região carboxi-terminal corresponde aos aminoácidos Glu388 a Asp571. Dentro dessa região estão localizadas seis das nove pontes dissulfeto da Lagp63, indicando que este domínio é extremamente rígido. Nessa região, se localiza o sítio ômega, o aminoácido no qual a âncora GPI é adicionada

Figura 4. Modelo estrutural da Lagp63. A) Estrutura tridimensional da Lagp63, onde vermelho, verde e azul representam as regiões amino-terminal, central e carboxi-terminal, respectivamente. B) Representação do átomo de zinco coordenado à cadeia lateral dos três resíduos de histidina do sítio catalítico.



3.4 Conservação estrutural da Lagp63

Tendo em vista a extensa conservação dos aminoácidos, como evidenciado na Fig. 2, foi empreendida a avaliação da conservação estrutural. Para tal, foi realizado o alinhamento estrutural entre Lagp63 e Lmgp63 (Fig. 5). O alinhamento estrutural entre Lagp63 e Lmgp63 revelou que ambas as proteínas apresentam as mesmas características estruturais, especialmente

das regiões carboxi-terminal e central. Ademais, o RMSD (*Root-mean-square deviation*) foi de 0,058 indicando grande similaridade estrutural entre as estruturas analisadas. Esse mesmo grau de conservação foi evidenciado em trabalhos anteriores (CALIXTO *et al.*, 2013; CALIXTO *et al.*, 2014).

A interação enzima/substrato não é regida exclusivamente pelos aspectos topológicos, sendo, portanto, multifatorial. Um

desses fatores são as cargas de superfície, especialmente as presentes na interface de contato entre a enzima e o substrato (SHEINERMAN *et al.*, 2000). Baseado no exposto foi realizado a investigação das cargas parciais de superfície. O perfil de distribuição das cargas parciais apontou que as fendas catalíticas, tanto da Lagp63, quanto

da Lmgp63, são positivas. Um padrão oposto ocorre ao redor da fenda catalítica das duas enzimas. Esse achado, associado à conservação estrutural, sugere que a Lagp63 pode interagir com os mesmos substratos clivados pela Lmgp63, desempenhando, portanto, funções semelhantes nos dois parasitos.

Figura 5. Alinhamento estrutural. As estruturas em vermelho e azul correspondem à Lagp63 e Lmgp63, respectivamente.

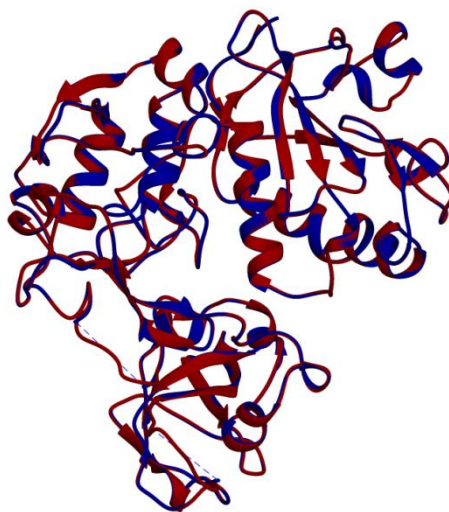
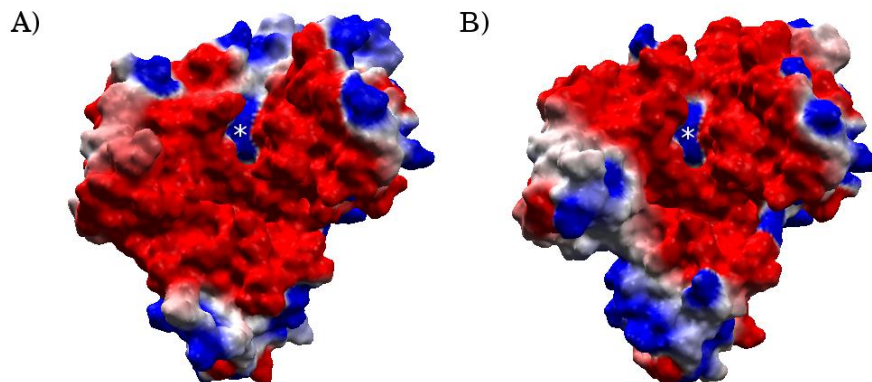


Figura 6. Distribuição das cargas parciais de superfície. As cores azul, vermelho e branco correspondem às cargas positiva, negativa e neutra, respectivamente. O asterisco aponta a localização do sítio catalítico.

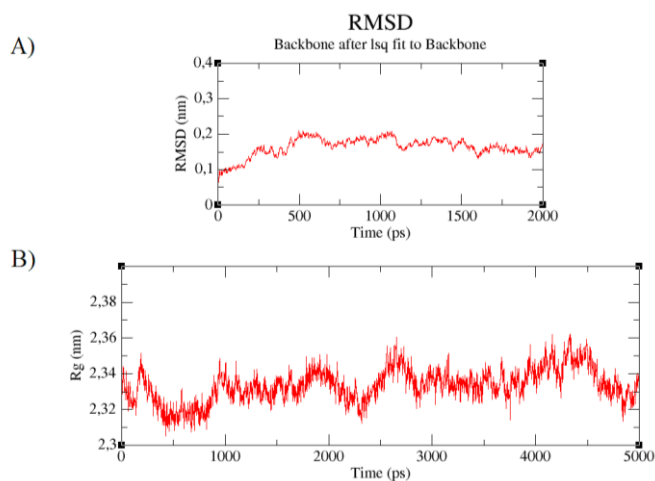


3.5 Dinâmica molecular da Lagp63

A fim de verificar o comportamento da proteína em água, foi realizado o ensaio de dinâmica molecular. A dinâmica consistiu na simulação de 5 ns, como verificado na figura 7. A análise do RMSD, isto é, quanto a proteína altera sua conformação em relação à estrutura original, indica que a Lagp63 se estabilizou por volta de 500 ps, permanecendo estável até o término da

simulação. A variação da Lagp63 no decorrer da dinâmica foi relativamente baixa, apresentando pico máximo de 2Å, refletindo a estabilidade proteica da estrutura. A análise do raio de giração, que reflete a qualidade da compactidade proteica, apontou que o enovelamento da Lagp63 é extremamente estável, diante da pequena variação no decorrer do tempo. Dados semelhantes foram relatados por Bianchini e colaboradores (2006) ao realizarem a dinâmica molecular da Lmgp63.

Figura 7. Dinâmica molecular da Lagp63. A) Variação do RMSD em função do tempo. B) Variação do raio de giração em função do tempo.



4. CONCLUSÃO

A Lagp63 possui importância capital na interação da *L. amazonensis* com o hospedeiro. Devido à importância, como fator de virulência, o estudo da Lagp63 abre novas possibilidades para o tratamento profilático e/ou terapêutico da infecção pela *L. amazonensis*, que poderia diminuir drasticamente o número de novos casos de LTA. Uma dessas possibilidades é o desenho racional de fármacos baseado na estrutura da Lagp63, tendo em vista sua alta qualidade e estabilidade estrutural. Por conseguinte, o parasito

seria eliminado diretamente pela ação do fármaco, ou pelo menos, teria sua densidade populacional reduzida, o que diminuiria a morbidade e possibilitaria a eliminação do parasito pelo sistema imunológico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence.

- PLoS One*, San Francisco, v. 7, n. 5, p. E35671. 2012.
- BALESTIERI, F. M.; QUEIROZ, A. R.; SCAVONE, C.; COSTA, V. M.; BARRAL-NETTO, M.; ABRAHAMSOHN, I. A. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes and Infection*, Paris, v. 4, n. 1, p. 23-29. 2002.
- BARCINSKI, M. A.; SCHECHTMAN, D.; QUINTAO, L. G.; COSTA, D. A.; SOARES, L. R.; MOREIRA, M. E.; CHARLAB, R. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases the infectivity of *Leishmania amazonensis* by protecting promastigotes from heat-induced death. *Infection and Immunity*, Washington, v. 60, n. 9, p. 3523-3527. 1992.
- BENDTSEN, J. D.; NIELSEN, H.; HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, Philadelphia, v. 340, n. 4, p. 783-795. 2004.
- BIANCHINI, G.; BOCEDI, A.; ASCENZI, P.; GAVUZZO, E.; MAZZA, F.; ASCHI, M. Molecular dynamics simulation of *Leishmania major* surface metalloprotease GP63 (leishmanolysin). *Proteins*, v. 64, n. 2, p. 385-390. 2006.
- BRYSON, K.; MCGUFFIN, L. J.; MARSDEN, R. L.; WARD, J. J.; SODHI, J. S.; JONES, D. T. Protein structure prediction servers at University College London. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 33 (Web Server), n. 1, p. W36-W38. 2005.
- CALIXTO PH, BITAR M, FERREIRA KA, ABRAHAO O, JR., LAGES-SILVA E, FRANCO GR, PEDROSA, AL. Gene identification and comparative molecular modeling of a *Trypanosoma rangeli* major surface protease. *Journal of molecular modeling*, v. 19, n. 8, p. 3053-3064. 2013.
- CALIXTO, P.H.M.; FAGUNDES, D.S.; SA-OLIVEIRA, J.C. Estrutura tridimensional da major surface protease de *Leishmania guyanensis* resolvida por modelagem comparativa. *Biota Amazônia*, v. 4, n. 1, p. 74-80. 2014.
- CONVIT, J.; ULRICH, M.; FERNANDEZ, C. T.; TAPIA, F. J.; CACERES-DITTMAR, G.; CASTÉS, M.; RONDÓN, A. J. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 87, n. 4, p. 444-448. 1993.
- ETGES, R.; BOUVIER, J.; BORDIER, C. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. *The Journal of Biological Chemistry*, Rockville, v. 261, n. 20, p. 9098-9101. 1986.
- GOMIS-RUTH, F. X. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Molecular Biotechnology*, New York, v. 24, n. 2, p. 157-200. 2003.
- HEY, A. S.; THEANDER, T. G.; HVIID, L.; HAZRATI, S. M.; KEMP, M.; KHARAZMI, A. The major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major* and *Leishmania donovani* cleaves CD4 molecules on human T cells. *The Journal of Immunology*, Bethesda, v. 152, n. 9, p. 4542-4548. 1994.
- JARAMILLO, M.; GOMEZ, M. A.; LARSSON, O.; SHIO, M. T.; TOPISIROVIC, I.; CONTRERAS, I.; LUXENBURG, R.;

- ROSENFELD, A.; COLINA, R.; McMASTER, R. W.; OLIVIER, M.; COSTA-MATTIOLI, M.; SONENBERG, N. *Leishmania* repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. *Cell Host Microbe*, Cambridge, v. 9, n. 4, p. 331-341. 2011.
- LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; McGETTIGAN, P. A.; McWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, Oxford, v. 23, n. 21, p. 2947-2948. 2007.
- LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, Chester, v. 26, n. 1, p. 283-291. 1993.
- McGWIRE, B. S.; O'CONNELL, W. A.; CHANG, K. P.; ENGMAN, D. M. Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence. *The Journal of Biological Chemistry*, Rockville, v. 277, n. 11, p. 8802-8809. 2002.
- PEI, J.; TANG, M.; GRISHIN, N. V. PROMALS3D web server for accurate multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 36 (Web Server), n. 1, p. W30-W34. 2008.
- PIERLEONI, A.; MARTELLI, P. L.; CASADIO, R. PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics*, London, v. 9, n. 392, p. 1-11. 2008.
- RAZZAZAN, A.; SABERI, M. R.; JAAFARI, M. R. Insights from the analysis of a predicted model of gp63 in *Leishmania donovani*. *Bioinformation*, Chennai, v. 3, n. 3, p. 114-118. 2008.
- SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, Philadelphia, v. 234, n. 3, p. 779-815. 1993.
- SCHLAGENHAUF, E.; ETGES, R.; METCALF, P. The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). *Structure*, Maryland Height, v. 6, n. 8, p. 1035-1046. 1998.
- SCHWEDE T. Protein modeling: what happened to the "protein structure gap"? *Structure*, v. 21, n. 9, p. 1531-1540. 2013.
- SHEINERMAN, F. B.; NOREL, R.; HONIG, B. Electrostatic aspects of protein-protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, Philadelphia, v. 10, n. 2, p. 153-159. 2000.
- VAN-DER-SPOEL D, LINDAHL E, HESS B, GROENHOF G, MARK AE, BERENDSEN HJ. GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, v. 26, n. 16, p. 1701-1718. 2005.
- WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in 15 three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 35 (Web Server), n. 1, p. W407-W410. 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the*

WHO Expert Committee on the Control of *Leishmaniasis*. Geneva: WHO, 2010, 202 p.

YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (gp63 or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Philadelphia, v. 132, n. 1, p. 1-16. 2003.