Entamoeba histolytica: Elucidação estrutural de uma *Major Surface Protease* não relacionada à Família Trypanosomatidae

Paulo Henrique Matayoshi Calixto[1]

[1] Instituto Federal de Santa Catarina

Resumo

A *Entamoeba histolytica* é um protozoário responsável por uma doença denominada amebíase. Na maioria dos casos, a amebíase se comporta como uma doença assintomática. Contudo, em aproximadamente 10% dos casos a amebíase apresenta pronunciamento de sintomas, que variam de disenteria e colite a sintomas decorrentes da forma invasiva da doença, como por exemplo disfunções hepáticas. A interação desse parasito com o hospedeiro humano envolve um refinado e íntimo relacionamento parasito-hospedeiro. Esses tipos de relacionamento, quase que totalmente, são governados pelas moléculas de superfície. Uma dessas moléculas é a *Major Surface Protease*, uma metaloprotease zinco-dependente. O objetivo deste estudo foi de determinar e caracterizar a estrutura tridimensional da MSP de *E. histolytica*. Para a determinação estrutural foi utilizada a técnica de modelagem comparativa. Como estrutura-molde foi empregada a MSP de *Leishmania major,* cujos percentuais de identidade e de similaridade foram de 28 e 45%, respectivamente. A estrutura da MSP de *E. histolytica* se apresentou como uma estrutura compacta e dividida em três grandes domínios: N-terminal, central e C-terminal. A estrutura também apresentou todos os elementos necessários para o seu processamento, bem como para o desempenho da atividade proteásica. Interessantemente, o padrão de distribuição das cargas de superfície da MSP de *E. histolytica* é o oposto do padrão observado na MSP de *L. major*, sugerindo que ambas as proteases não apresentam compartilhamento de substratos.

Palavras-chave: *Entamoeba histolytica, Major Surface Protease*, Modelagem Comparativa, amebíase.

Entamoeba histolytica: Structural elucidation of Major Surface Protease not related to the Trypanosomatidae Family

Abstract

Entamoeba histolytica is a protozoan that causes a disease called amebiasis. In most cases, amebiasis behaves as an asymptomatic disease. However, in approximately 10% of cases, amebiasis presents symptoms, ranging from dysentery and colitis to symptoms resulting from the invasive form of the disease, such as liver dysfunctions. The interaction of this parasite with the human host involves a refined and intimate parasite-host relationship. These types of relationships, almost totally, are governed by surface molecules. One of these molecules is the Major Surface Protease, a zinc-dependent metalloprotease. The objective of this study was to determine and characterize the three-dimensional structure *E. histolytca* MSP. For the structural determination, the comparative modeling technique was employed. The *Leishmania major* MSP was used as the template structure, whose identity and similarity percentages were 28 and 45%, respectively. The *E. histotylica* MSP presented as a compact structure and divided into three major domains: N-terminal, central and C-terminal. The structure also presented all the necessary elements for its processing, as well as for the performance of the protease activity. Interestingly, the pattern of surface charge distribution

of *E. histolytica* MSP is the opposite of the pattern observed in *L. major* MSP, suggesting that both proteases do not share the same substrate.

Keywords: *Entamoeba histolytica,* Major Surface Protease, Comparative Modeling, amebiasis.

1. INTRODUÇÃO

A *Entamoeba histolytica* é um protozoário parasito de seres humanos. É responsável por uma doença nomeada amebíase, cuja mortalidade global é de aproximadamente 11.000 mortes por ano. Mesmo sendo uma infecção potencialmente fatal, apenas cerca de 10% dos indivíduos com amebíase desenvolvem sintomas de alguma ordem, enquanto que os outros 90% dos indivíduos permanecem assintomáticos (SHIRLEY *et al.,* 2018). Até o momento, não há informações suficientemente cabais capazes de explicar o pronunciamento ou não dos sintomas. Contudo, evidências indicam que fatores relacionados ao hospedeiro, tais como estado nutricional e o tipo da resposta imune, bem como fatores ligados ao protozoário, como por exemplo a cepa de *E. histolytica* e sua relação com outros microrganismos, estejam por trás do desenvolvimento dos sintomas e do agravamento ou não da doença (NAGARAJA; ANKRI, 2018). De fato, mais recentemente, foi verificado que a *E. histolytica* interage diretamente com bactérias do microbioma intestinal, sendo estas capazes de modular o perfil de patogenicidade do parasito e predispor o desenvolvimento da amebíase intestinal e também de abcessos amebóicos hepáticos, sendo esta última uma forma invasiva da amebíase. Diante do exposto, é possível depreender que a *E. histolytica* apresenta um refinado processo de interação parasito-hospedeiro (PARTIDA-RODRÍGUEZ, *et al.,* 2017; LEON-CORIA, *et al.,* 2018). Sabe-se que as proteínas de superfície dos protozoários governam, quase que totalmente, o relacionamento parasito-hospedeiro (MCINERNEY *et al.,* 2003). Uma dessas moléculas é a *Major Surface Protease* (MSP), uma protease intimamente relacionada à família Trypanosomatidae, tais como o gênero *Trypanosoma* e, especialmente, ao gênero *Leishmania.*

As MSPs foram inicialmente descritas no gênero *Leishmania* (BOUVIER *et al.,* 1995). Nas espécies desse gênero, as MSPs atuam como protagonistas na interação parasito-hospedeiro. As funções das MSPs em *Leishmania,* incluem: i) o favorecimento da sobrevivência do parasito no interior do macrófago; ii) a clivagem de macromoléculas da célula hospedeira, garantindo ao parasito proteção e/ou nutrição; iii) a direta interação com células *natural killer*, inativando-as; iv) a interferência da eficiência da resposta humana por meio da clivagem do receptor CD4 de linfócitos T; v) o envolvimento na degradação de mTOR do macrófago (*mammalian or mechanistic target of rapamycin*), um dos principais reguladores da síntese proteica, conduzindo esta célula a um estado de anergia e, consequentemente, favorecendo a replicação do parasito; vi) o acesso ao núcleo da célula hospedeira e a consequente interrupção do tráfego de proteínas para o ambiente intranuclear; vii) interação direta com os receptores celulares do macrófago, favorecendo o processo de internalização do parasito (HEY *et al.,* 1994; SEAY *et al.,* 1996; PUENTES, *et al.,* 1999; LIEKE *et al.,* 2008; JARAMILLO *et al.,* 2011; ISNARD *et al.,* 2015). Mesmo sendo uma protease extensivamente estudada, seu papel em *E. histolytica*, um protozoário sem proximidade genética com a *Leishmania*, ainda é desconhecido. Diante da falta de informações acerca dessa protease, o

objetivo deste estudo foi de determinar e caracterizar a estrutura tridimensional da MSP em *E. histolytica*, doravante designada como EhMSP. As informações geradas pela elucidação da estrutura são importantes para o entendimento do funcionamento da EhMSP. Essas informações poderão ser utilizadas para o desenvolvimento de novas estratégias, tais como o desenho racional de fármacos, para a eliminação, ou pelo menos, para a diminuição da carga parasitária.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Recuperação de sequências e estruturas

A sequência de aminoácidos da EhMSP utilizada neste trabalho foi recuperada a partir do *GenBank* e apresenta o seguinte número de acesso: XP_655394.1. 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, foi realizada usando as seguintes ferramentas: a) SignalP (BENDTSEN *et al.,* 2004) para a identificação do peptídeo sinal; b) TMHMM (KROGH *et al.,* 2001) para a identificação de resíduos de aminoácidos transmembranares; c) Clustal Omega (SIEVERS *et al.,* 2014) para o alinhamento de sequências de aminoácidos.

2.3 Geração da estrutura terciária e análises computacionais complementares

Neste estudo, utilizamos a sequência da EhMSP recuperada do GenBank (XP_655394.1). O alinhamento de sequências foi gerado pelo programa Clustal Omega em modo *default*. Já a predição da estrutura secundária foi realizada através do *software* PSI-PRED (BRYSON *et al.,* 2005).

A estrutura terciária da EhMSP 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 EhMSP 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 EhMSP, 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 EhMSP 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 Potencials 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 *Hardware*

Este trabalho foi conduzido em um computador com a seguinte configuração: 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.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização da estrutura primária da EhMSP

Por se tratar de uma enzima extracelular, o primeiro elemento *cis* a ser buscado foi o peptídeo sinal (PS). O *software* SignalP 4.1, indicou os resíduos N-MLIVLLLISFTFA-C como PS, com clivagem entre os resíduos Ala13 e Glu14 (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 MSP 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 de domínios transmembranares. Para tal, foi utilizado o *software* TMHMM, que apontou os resíduos Leu605 a Val643 (Figura 1) como domínios transmembranares, responsáveis por ancorar a EhMSP na superfície da *E. histolytica* (KROGH *et al.,* 2001). 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 EhMSP e LmMSP. Os resultados apontaram os aminoácidos Glu14 a Asp38, com destaque para a Cys15, como participantes do *cysteine switch;* esse trecho de aminoácidos também é referido como propeptídeo (Fig. 1). 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 projetado no interior da fenda catalítica. Consequentemente, enxofre, presente na cadeia lateral da cisteína, atuará como quelante do íon zinco, impedindo o processo de hidrólise (GOMIS-RUTH, 2003).



Figura 1: Caracterização da estrutura primária da EhMSP: As letras marcadas na cor cinza, correspondem ao peptídeo sinal. Os aminoácidos marcados em preto representam o propetídeo, já o aminoácido marcado por um círculo representa o resíduo de cisteína envolvido no processo de *cysteine switch.* Os aminoácidos coloridos em vermelho indicam os resíduos do sítio catalítico. A cor azul aponta os domínios transmembranares, responsáveis pelo ancoramento da EhMSP na superfície do parasito.

3.2 Determinação da estrutura da EhMSP

A estrutura da EhMSP foi determinada por modelagem comparativa, utilizando o princípio da modelagem por restrições espaciais. A pesquisa por estruturas no PDB revelou uma única estrutura-molde, a MSP de *L. major* (LmMSP), sob o código de identificação PDB 1LML. O alinhamento das sequências revelou que ambas compartilham 28% e 45% de resíduos idênticos e similares, respectivamente (Figura 2). Ainda em relação ao alinhamento, é importante relatar a presença de 13 resíduos de cisteína conservados entre as duas sequências. Esse achado indica que, possivelmente, essas sequências apresentam também conservação estrutural, uma vez que as cisteínas estão envolvidas na formação de pontes dissulfeto. Em adição às cisteínas, ambas as sequências compartilham a posição de 7 prolinas. Estas, devido a peculiaridade de sua cadeia lateral, influenciam a estrutura 3D da proteína. Após o cumprimento do alinhamento, o processo de modelagem seguiu para as etapas subsequentes.

Após a geração das coordenadas e a modelagem das alças, as estruturas foram inspecionadas visualmente e adicionadas de átomos necessários ao funcionamento molecular, tais como hidrogênios, água catalítica e do heteroátomo zinco. Posteriormente, as estruturas foram submetidas ao campo-de-força OPLS-2005 (*Optimized Potentials of Liquid Simulations*) para a minimização da energia. Finalmente, a estrutura foi remetida ao processo de validação estrutural, a fim de assegurar a confiabilidade do modelo gerado. Esse processo consistiu na verificação da satisfação de critérios estereoquímicos, interação de átomos não-ligados e na determinação da qualidade geral, sendo realizado pelos *softwares* Procheck, ERRAT e ProSa, respectivamente. Após o refinamento as estruturas foram depositadas no PMDB-Caspur, um banco de dados para estruturas determinadas por métodos *in silico.*

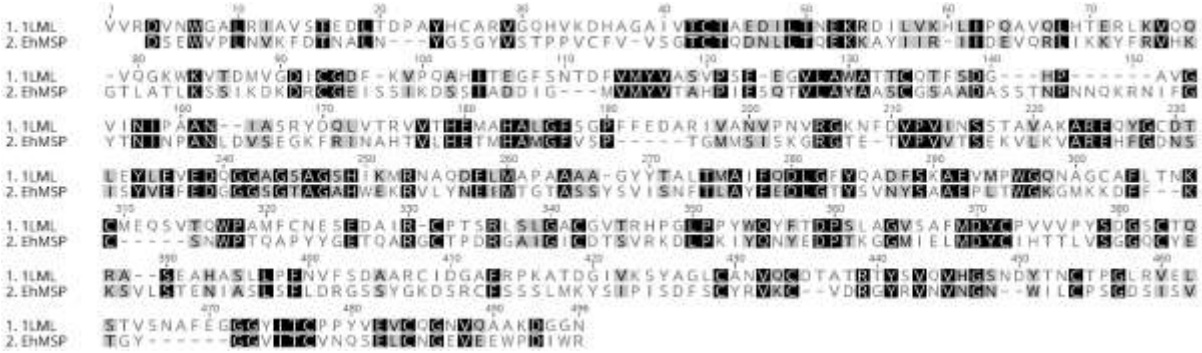

Figura 2. Alinhamento local entre EhMSP e 1LML: Aminoácidos contidos nos *boxes* de cores preta, cinza e branca correspondem aos resíduos idênticos, similares e divergentes, respectivamente.

3.3 Caracterização estrutural da EhMSP

De maneira geral, o modelo 3D da EhMSP, visualizada na figura 3A, apresenta estrutura compacta, sendo composta por 18 fitas-β e 15 α-hélices e dividida em três domínios estruturais: amino-terminal, central e carbóxi-terminal. A manutenção da estrutura é fortemente influenciada por 18 resíduos de cisteína, envolvidos na formação de 9 pontes dissulfeto. Das nove pontes dissulfeto, seis se localizam no domínio carbóxi-terminal, sugerindo uma possível rigidez deste domínio. O domínio amino-terminal apresenta duas pontes dissulfeto, sendo a

ponte dissulfeto de número 2 responsável por tracionar a fita-β III para cima, aproximando-a da fita-β IV. Já o domínio central possui uma única ponte dissulfeto, bem como um resíduo de cisteína, responsável por interagir com outro resíduo de cisteína presente no domínio carbóxi-terminal e, consequentemente, formar uma ponte dissulfeto para conectar esses dois domínios.

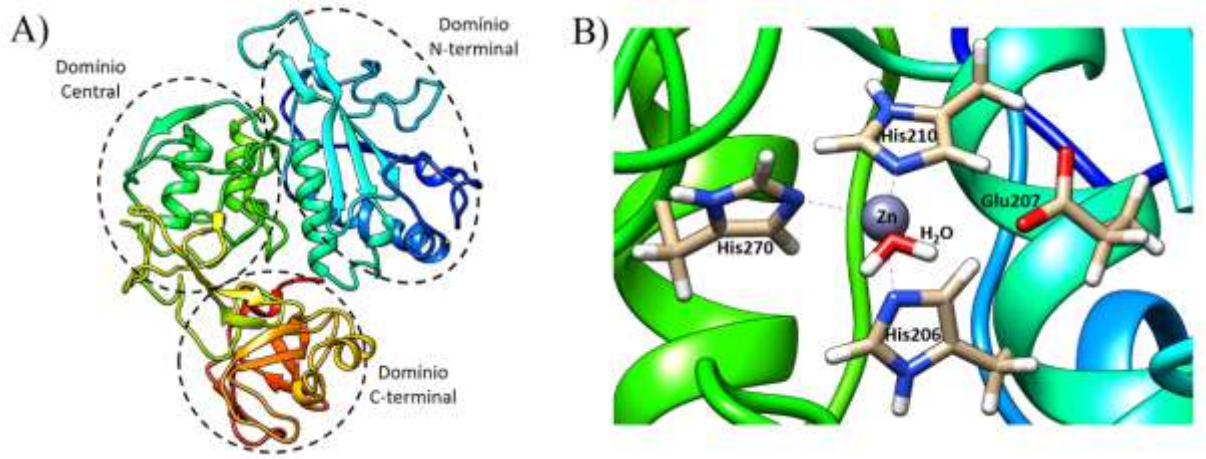

Figura 3. Representação tridimensional da EhMSP: a) Estrutura terciária da EhMSP, os domínios N-terminal, central e C-terminal estão delimitados. b) Vista ampliada do sítio catalítico. O átomo de zinco está coordenado às cadeias laterais da histidina e a uma molécula de água em distâncias inferiores a 3 Å.

O domínio N-terminal corresponde aos resíduos de Asp38 a Thr341 e possui, como mencionado acima, um padrão de enovelamento semelhante ao módulo catalítico de outras zinco-proteases. Este domínio apresenta três dos quatros resíduos envolvidos na composição do sítio catalítico, histidina 206, ácido glutâmico 207 e histidina 210, que constitui o *motif* de assinatura desta classe de zinco-proteases. Esse domínio também possui uma profunda fenda na interface do sítio ativo, que está localizada entre os domínios N-terminal e central da molécula. O *motif* HE*XX*H está localizado na hélice B e as cadeias laterais das duas histidinas estão em coordenação com o átomo de zinco no sítio catalítico como mostrado na figura 3B. Diferentemente dos demais membros do clã das Metzincinas, a EhMSP não possui cinco fitas-β compondo o módulo catalítico, mas sim, quatro fitas-β, contudo essa ausência não parece influenciar a estrutura do módulo catalítico. A fita-β ausente é substituída por uma alça de 39 aminoácidos. A EhMSP conta ainda com uma segunda inserção de 37 resíduos na alça que conecta a fita-β 2 e a α-hélice de número 2.

O domínio central compreende os resíduos de Ser216 a Lys366 e possui um padrão de *folding* composto por hélices organizadas de modo antiparalelas (H6 e H7) e fitas-β, também antiparalelas S8, S9 e S10 formando o centro do domínio. Uma única ponte dissulfeto (resíduos Cys328-Cys386) é responsável pela conexão entre o domínio central e o domínio C-terminal.

Membros do clã das Metzincinas possuem o *motif* estendido HE*XX*H*XX*G*XX*H, onde o resíduo de glicina faz parte de uma pequena alça que projeta o terceiro resíduo de histidina dentro do sítio catalítico, colocando a cadeia lateral desse aminoácido em coordenação com o átomo de zinco. Interessantemente, a EhMSP apresenta uma inserção de 54 aminoácidos entre a glicina do *motif* estendido das zinco-proteases e a histidina que faz ligação com o zinco.

Proteases membros do clã das Metzincinas apresentam um resíduo

conservado de metionina após a terceira histidina que compõe o sítio catalítico. Essa metionina está presente em uma alça e forma uma estrutura chamada *Met-turn* ou alça de metionina. A EhMSP apresenta uma estrutura compatível com o *Met-turn*, formada pelo *motif* DELMA, onde o resíduo de metionina é projetada logo abaixo do sítio catalítico, formando uma espécie de assoalho.

O sítio catalítico da EhMSP é composto pela união dos domínios amino-terminal e central. O posicionamento dos resíduos ao redor do átomo de zinco do sítio catalítico é semelhante ao de outras zinco-proteases. O átomo de zinco está coordenado ao nitrogênio-épsilon (ε-N) da cadeia lateral da His206, His210 e His270 em distâncias de 2,20 Å, 2,21 Å e 2,85 Å, respectivamente (Figura 3B). Em adição aos três resíduos de histidinas do sítio catalítico, existe uma molécula de água em coordenação com o zinco, distante 1,98 Å. Essa molécula de água está presente entre o átomo de zinco e o átomo de oxigênio do ácido glutâmico no *motif* conservado HE*XX*H. A molécula de água coordenada ao zinco tem um papel chave na proteólise, sendo o nucleofílico o responsável por atacar a ligação peptídica do substrato.

O domínio C-terminal, em comparação com o C-terminal de outros membros da Metzincina, é alongado e formado exclusivamente por fitas-β paralelas e compreende os aminoácidos de número Ile367 a Glu494. O domínio C-terminal conta com seis das nove pontes dissulfeto da estrutura e, provavelmente, a grande quantidade de pontes dissulfeto esteja relacionado com a rigidez desse domínio.

3.4 Conservação da estrutural da EhMSP e determinação do perfil das cargas parciais de superfície

Para verificar, com maior profundidade, o grau de similaridade entre a EhMSP e a LmMSP utilizada como estrutura-molde, foi realizado um alinhamento estrutural com o auxílio do *software* Chimera (Figura 4). O qual verificou um RMSD (*Root-Mean-Square Deviation*) de 0,302 Å. O RMSD reflete a intensidade de variação entre as estruturas, assumindo valores maiores à medida que as estruturas divergem entre si. O baixo valor do RMSD para as estruturas de EhMSP e LmMSP, é um indicativo da alta semelhança entre as duas estruturas.

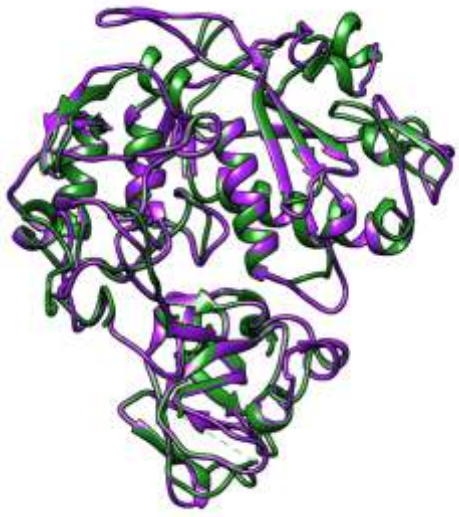

Figura 4. Sobreposição estrutural: Alinhamento estrutural entre EhMSP (roxo) e LmMSP (verde), evidenciando a grande conservação estrutural, sobretudo, dos subdomínios C-terminal e central.

Outro aspecto analisado, foi a conservação das cargas parciais de superfície entre EhMSP e LmMSP. Como visualizado na figura 5, as duas proteases apresentam o mesmo perfil de distribuição das cargas de superfície, ou seja, predominantemente positivo. Além disso, ambas proteases apresentam sítios catalíticos com volumes semelhantes, sendo de 391Å³ para EhMSP e de 257 Å³ para a LmMSP.

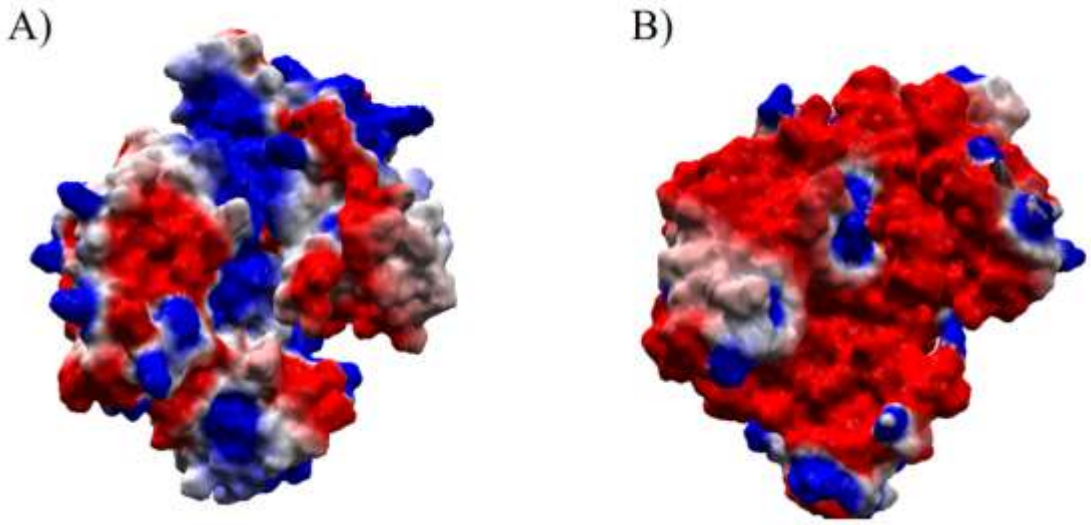

Figura 5. Mapa de distribuição de cargas: Representação das cargas parciais de superfície da EhMSP (A) e LmMSP (B). As cores azul, vermelho e branco correspondem às cargas positiva, negativa e neutra, respectivamente.

4. CONCLUSÃO

As MSPs são proteases multifuncionais em membros da família Trypanosomatidae, mais notadamente nos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma.* A presença de MSPs estruturalmente conservadas em *E. histolytica,* sugere que essa molécula participa, pelo menos em parte, do processo de interação parasito-hospedeiro, podendo assegurar ao parasito nutrição, evasão e/ou sobrevivência. A determinação da estrutura da EhMSP abre novas possibilidades para o desenho racional de fármacos ou o uso de outras abordagens que vise a eliminação ou, pelo menos, a diminuição da carga parasitária.

5. REFERÊNCIAS

BENDTSEN, Jannick Dyrlov *et al.* Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. Journal of molecular biology, v. 340, n. 4, p. 783-795, 2004.

BOUVIER, Jacques; SCHNEIDER, Pascal; ETGES, Robert. [37] Leishmanolysin: Surface metalloproteinase of *Leishmania*. In: Methods in enzymology. Academic Press, 1995. p. 614-633.

BRYSON, Kevin *et al.* Protein structure prediction servers at University College London. Nucleic acids research, v. 33, n. suppl_2, p. W36-W38, 2005.

GOMIS-RÜTH, F. Xavier. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. Molecular biotechnology, v. 24, n. 2, p. 157-202, 2003.

HEY, A. S. *et al.* The major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major* and Leishmania donovani cleaves

CD4 molecules on human T cells. J Immunol, v. 152, n. 9, p. 4542-8, May 01 1994.

ISNARD, A. *et al.* Impact of *Leishmania* infection on host macrophage nuclear physiology and nucleopore complex integrity. PLoS Pathog, v. 11, n. 3, p. e1004776, Mar 2015.

JARAMILLO, M. *et al. Leishmania* repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. Cell Host Microbe, v. 9, n. 4, p. 331-41, Apr 21 2011.

KROGH, Anders *et al.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. Journal of molecular biology, v. 305, n. 3, p. 567-580, 2001.

LASKOWSKI, Roman A. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. Journal of applied crystallography, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.

LEON-CORIA, Aralia *et al*. Defining cooperative roles for colonic microbiota and Muc2 mucin in mediating innate host defense against *Entamoeba histolytica*. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 11, p. e1007466, 2018.

LIEKE, T. *et al. Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. Clin Exp Immunol, v. 153, n. 2, p. 221-30, Aug 2008.

MCINERNEY, James O.; LITTLEWOOD, D. T.; CREEVEY, Christopher J. Detecting adaptive molecular evolution: additional tools for the parasitologist. **Adv Parasitol**, v. 54, p. 359-79, 2003.

NAGARAJA, Shruti; ANKRI, Serge. Utilization of different omic approaches to unravel stress response mechanisms in the parasite *Entamoeba histolytica*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 19, 2018.

PARTIDA-RODRÍGUEZ, Oswaldo *et al*. Human intestinal microbiota: interaction between parasites and the host immune response. **Archives of medical research**, 2017.

PEI, Jimin; GRISHIN, Nick V. PROMALS: towards accurate multiple sequence alignments of distantly related proteins. Bioinformatics, v. 23, n. 7, p. 802-808, 2007.

PUENTES, F. *et al. Leishmania:* fine mapping of the Leishmanolysin molecule's conserved core domains involved in binding and internalization. Experimental parasitology, v. 93, n. 1, p. 7-22, 1999.

SALI, Andrej; BLUNDELL, Tom L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. Journal of molecular biology, v. 234, n. 3, p. 779-815, 1993.

SEAY, M. B.; HEARD, P. L.; CHAUDHURI, G. Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. Infect Immun, v. 64, n. 12, p. 5129-37, Dec 1996.

SHIRLEY, Debbie-Ann T. *et al*. A Review of the Global Burden, New Diagnostics, and Current Therapeutics for Amebiasis. In: **Open forum infectious diseases**. US: Oxford University Press, 2018. p. ofy161.

SIEVERS, Fabian; HIGGINS, Desmond G. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. In: Multiple sequence alignment methods.

Humana Press, Totowa, NJ, 2014. p. 105-116.

WIEDERSTEIN, Markus; SIPPL, Manfred J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. Nucleic acids research, v. 35, n. suppl_2, p. W407-W410, 2007.