



Carboidrato α -Gal acoplado à VLP como candidato vacinal contra leishmaniose causada por *Leishmania infantum* e *L. amazonensis*.

ANA PAULA VENUTO MOURA

Belo Horizonte

2016

ANA PAULA VENUTO MOURA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia

Orientação: Prof. Dr. Alexandre Ferreira Marques

Belo Horizonte

2016

Colaboradores

Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu (UFMG)

Dr. Mauricio Roberto Viana Sant'Anna (UFMG)

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara (UFMG)

Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli (UFMG/FIOCRUZ)

Suporte Financeiro:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais/FAPEMIG

Conselho Nacional de Pesquisa/CNPq

*“Minha mãe achava estudo a coisa mais fina do mundo. Não é.
A coisa mais fina do mundo é o sentimento.”*
(Adélia Prado)

Aos meus pais, Egnaldo e Márcia (*in memorian*),
pelo amor ensinado e vivido!

Aos meus filhos, Júlia e Rodrigo,
presentes de Deus, meus amores,
por serem os motivos maiores da minha coragem e esperança!

Ao meu amor, Evandro,
pela vida compartilhada com alegria, por seguirmos juntos!

Aos meus amados irmãos, Márcia, Flávio e Gustavo,
por estarem sempre ao meu lado, com tanto afeto e carinho!

À minha sobrinha e afilhada, Carol,
por adoçar a minha vida e por me entender tanto!

Sem vocês nada disso iria acontecer!

AGRADECIMENTOS

Ao meu mestre maior, Jesus, por me ensinar a amar o próximo, a ser grata pela vida e a ter fé que Deus sempre cuida de mim!

Ao meu orientador, Professor Alexandre Ferreira Marques, por me acolher pacientemente na orientação desse trabalho. A sua grandeza se faz presente na sua forma simples de conduzir saberes tão sofisticados. A confiança depositada em mim foi fundamental para que eu chegasse até aqui. A você, Professor, todo o meu respeito e gratidão.

À Professora Héliida Monteiro de Andrade, que foi a primeira a me receber na UFMG por todos os ensinamentos. Muito obrigada pelo tempo de convivência no Laboratório de Leishmanioses.

A todos os professores que ministraram disciplinas no Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Aprendi muito com todos vocês.

Ao Professor Ricardo Wagner de Almeida Vitor, por ter participado da minha qualificação com contribuições preciosas. Por suas aulas impecáveis, por ser o exemplo de professor que quero seguir.

Aos Professores Alan Lane de Melo e Stefan Michael Geiger, pela condução do trabalho de campo em Januária e São Joaquim. Foram momentos essenciais para a minha formação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da UFMG e às secretárias Sumara e Sibeles, pela disponibilidade e gentileza ao atender todas as minhas solicitações.

A todos que convivi no Laboratório de Leishmanioses, Angélica, Adriana, Bruna, Lívia, Luciano, Gabi, Júnior, João Carlos, Simone e Tamara. Muito obrigada pelos momentos compartilhados.

À amiga Aretha, por ter me recebido em sua casa quando cheguei em Belo Horizonte. Por vários momentos especiais e inesquecíveis, entre discussões científicas e filosóficas. Foi um privilégio morar com você no meu primeiro ano de doutorado.

Aos amigos do Laboratório de Imuno-Proteoma e Biologia de Parasitos, Maíra, Gisele, Luiza e Ramon. Foi muito gratificante construirmos juntos com o Professor Alexandre um biotério e um laboratório. Obrigada por tudo!

Às amigas de Natal, Andressa e Daniela. Tenho grande carinho por vocês, sempre me encontraram com sorrisos e um humor especial, que dá gosto de ver.

Aos grandes amigos e amigas de Montes Claros, Roberto, Karine, Maurício e Marilene! Apesar da distância, o afeto é gigante.

À amiga Soraia Oliveira, pela disponibilidade em me ajudar, por tantos ensinamentos sobre *Leishmania* e sobre a organização de um laboratório de pesquisa na UFMG.

Ao pessoal do café, Sr. Nery, Afonso, Rosálida, Joãozinho, Edna e Tatiana, que sempre foram muito agradáveis e carinhosos comigo durante nossos encontros.

À querida e saudosa Elen Márcia (*in memoriam*), por ter sido sempre gentil comigo e por ter me ensinado a cuidar e a gostar dos animais do biotério.

Aos pesquisadores e estudantes colaboradores de algumas etapas desse trabalho, Jordanna Celeste, Carlos Ramon Brito, Luiza Costa, Soraia Oliveira, Adalberto P. Filho, Edward Valencia, Luiza Almeida, Rayane Lucas e Dra. Caroline Junqueira. Vocês foram muito importantes para que tudo desse certo.

Às amigas da Unimontes, Sônia, Dora, Maria Alice e agora também a querida Thallyta! Obrigada por sempre me representarem em tudo que precisei durante esse período de afastamento e pela amizade de sempre.

A todos vocês, a minha gratidão!

Agradecimentos especiais

À Elaine, uma amiga que conheci durante o doutorado. Obrigada pelo grande incentivo nos momentos em que eu achei que as dificuldades estavam maiores que a chance de continuar. Muito obrigada por tudo! A nossa amizade é para sempre!

Ao Carlos Ramon, meu querido amigo e conselheiro científico. Obrigada por você ser brilhante em tudo que faz e tão meu amigo!

As minhas queridas amigas, Jordanna e Ivana. Obrigada pelos incontáveis ensinamentos na bancada de experimentos, e por tantos outros momentos de amizade partilhados.

A Luiza, pela ternura e permanente ajuda em todos os meus experimentos!

A minha família, que esteve sempre comigo, especialmente minha irmã Márcia e a minha tia Elzinha, que me acolheram em suas casas durante a preparação para a seleção do doutorado. Muito amor e gratidão sempre!

Aos meus compadres e queridos amigos, Fábio e Andréa, pelo apoio incondicional para que eu iniciasse o doutorado, pela amizade de quase 30 anos, pela constante troca de ideias que sempre contribuíram para as minhas decisões mais importantes. Gratidão eterna!

Às incríveis amigas, Graça e Samantha, que estiveram comigo antes e durante todo o tempo de doutorado mesmo de longe! Por me oferecerem as suas casas durante o tempo que fiquei entre Belo Horizonte e Montes Claros. Muito obrigada, queridas, por sempre me receberem com tanto carinho!

*“O saber a gente aprende com os mestres e os livros.
A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes. ”*
(Cora Coralina)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS.....	16
RESUMO	19
ABSTRACT	20
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1. O gênero <i>Leishmania</i> e as leishmanioses	23
2.2. O ciclo evolutivo	25
2.3. A situação atual das leishmanioses.....	26
2.4. Aspectos gerais da interação parasito/hospedeiro	28
2.5. Principais moléculas presentes na superfície de <i>Leishmania</i>	30
2.6. O epítipo α -Gal.	31
2.6.1. Anticorpos anti- α -Gal.....	33
2.7. Modelos experimentais para o estudo das leishmanioses.....	35
2.7.1. O modelo murino C57BL/6.....	35
2.7.2. O modelo C57BL/6 <i>knockout</i> para α 1,3-galactosiltransferase (α GalT-KO).....	38
3. OBJETIVOS	40
3.1. Objetivo Geral:	40
3.2. Objetivos Específicos:	40
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	41
4.1. Fase 1: Detecção do epítipo α -Gal nas formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i>	41
4.2. Fase 2: Infecções experimentais	42
4.3. Fase 3: Imunizações com α -Gal acoplado ao Q β “ <i>Virus Like Particle</i> ” (Q β - α -Gal)	42
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
5.1. Metodologia utilizada na fase 1:.....	44
5.1.1. Obtenção das formas promastigotas	44
5.1.2. Ensaio de imunofluorescência de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i>	44
5.1.3. Citometria de fluxo	45
5.1.4. Extração de proteínas totais	45
5.1.5. Dosagem de proteínas.....	46
5.1.6. ELISA para o epítipo α -Gal.....	46
5.1.7. Tratamento com <i>Green Coffee Beans</i> α -Galactosidase	46

5.1.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	47
5.1.9. <i>Western Blot</i>	47
5.1.10. Purificação de proteínas contendo α -Gal por cromatografia de afinidade.....	48
5.2. Metodologia utilizada na fase 2:.....	48
5.2.1. Animais.....	48
5.2.2. Preparação dos inóculos	49
5.2.3. Grupos experimentais	50
5.2.3.1 Grupos <i>wild type</i> para α -1,3 galactosiltransferase (α GalT-WT)	50
5.2.3.2. Grupos <i>Knockout</i> para α -1,3 galactosiltransferase (α GalT-KO).....	50
5.2.3.3. Procedimentos de coleta de sangue e de órgãos	51
5.2.3.4. Avaliação sorológica por ELISA.....	51
5.2.3.5. Avaliação da carga parasitária tecidual de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> por PCR quantitativa (qPCR).....	51
5.2.3.5.1.Extração de DNA.....	52
5.2.3.5.2. Iniciadores utilizados na PCR-quantitativa	52
5.2.3.5.3. PCR quantitativa.....	53
5.3. Metodologia utilizada na fase 3:.....	53
5.3.1. Imunizações	53
5.3.2. Avaliação da produção de anticorpos anti α -Gal, e avaliação da carga parasitária nos grupos experimentais da fase 3.....	56
5.4. Análise estatística	57
6. RESULTADOS	58
Apresentação dos resultados.....	58
6.1. RESULTADOS OBTIDOS NA FASE 1	59
6.1.1. Identificação do epítipo α -Gal nas formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i>	59
6.1.1.1. Análise da presença do epítipo α -Gal por microscopia	59
6.1.1.2. Análise da presença do epítipo α -Gal por citometria de fluxo	59
6.1.2. Identificação do epítipo α -Gal nos lisados de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i>	60
6.1.2.1. Análise da presença do epítipo α -Gal por ELISA e da especificidade da reação com tratamento com α -Galactosidase.....	60
6.1.2.2. Análise da presença do epítipo α -Gal por <i>Western Blot</i>	61
6.1.2.3. Análise do extrato de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> após purificação em coluna de lectina	62
6.1.2.4. Perfil de bandas das proteínas após purificação em coluna de Lectina (MOA).....	62
6.1.2.5. Análise da presença de α -Gal nos extratos purificados em coluna de Lectina (MOA) por ELISA	63
6.2. RESULTADOS OBTIDOS NA FASE 2	65

6.2.1. Avaliação da produção de anti- α -Gal nos grupos experimentais de camundongos C57BL/6 <i>Knockout</i> (α GalT-KO) e <i>wild type</i> (α GalT-WT) para α -galactosiltransferase, infectados por <i>L. amazonensis</i> e por <i>L. infantum</i> .	65
6.2.2. Avaliação da carga parasitária no baço e no fígado dos animais dos grupos experimentais de camundongos C57BL/6 <i>Knockout</i> (α GalT-KO) e <i>wild type</i> (α GalT-WT) para α -galactosiltransferase, infectados por <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> .	66
6.3. RESULTADOS OBTIDOS NA FASE 3	68
6.3.1. Avaliação da produção de IgG anti- α -Gal por camundongos imunizados com partículas de Q β - α -Gal	68
6.3.2. Avaliação da carga parasitária no baço e fígado dos grupos de camundongos C57BL/6 <i>Knockout</i> para α -galactosiltransferase imunizados (α GalT-KOI) e não imunizados com α -Gal (α GalT-KO), infectados por <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> .	69
7. DISCUSSÃO	71
8. CONCLUSÕES	75
9. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	76
9.1. Manuscrito em preparação	76
9.2. Manuscrito submetido e aceito (co-autora)	85
9.3. Artigo publicado (co-autora)	86
9.4. Participação em eventos científicos	87
10- ANEXOS	89
10.1- Anexo 1- Aprovação do projeto pelo CEUA- UFMG	89
10.2. Anexo 2- Curvas de dissociação dos iniciadores para PCR quantitativa.	90
REFERÊNCIAS	91

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Ciclo evolutivo:** representação esquemática do ciclo de vida de *Leishmania sp.* (adaptado de Assis et al. 2012) 26
- Figura 2: Distribuição mundial da Leishmaniose Cutânea:** países ou áreas com risco de transmissão (Fonte: WHO Leishmaniasis control programme. Annual country reports, 2013) 27
- Figura 3: Distribuição mundial da Leishmaniose Visceral:** países ou áreas com risco de transmissão (Fonte: WHO Leishmaniasis control programme. Annual country reports, 2013) 27
- Figura 4: Ilustração do epítipo α -Gal (Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc R).** (Adaptado Schocker et al. 2016)..... 32
- Figura 5: Ilustração de epítipos de α -Gal (marcados por retângulos por linhas tracejadas) em glicoproteínas (A) e em glicolípídeos (B).** A figura mostra também o local de ligação do anticorpo anti-Gal (Galili 2015) 32
- Figura 6: Preparação da nanopartículas de α -Gal e de Q β -Glicose acopladas ao VLP:** As partículas foram convertidas em seus derivados de alquino e foram ligadas ao bacteriófago por um procedimento de dois passos em que a proteína foi acilada primeiro em um éster N-hidroxissuccinimida terminal azida (NHS- azide) e, em seguida, dirigida por cicloadição azida-alcino, catalisada por cobre e preparação de nanopartículas (Strable e Finn, 2009)..... 54
- Figura 7: Protocolo de vacinação nos camundongos α GalT-KO:** Os camundongos foram imunizados com 3 doses de 10 μ g Q β - α Gal. Uma semana após a última imunização foi realizado ELISA anti- α -Gal e todos os grupos foram infectados com 10⁷ de promastigotas de *L. infantum* (por via intraperitoneal) e *L. amazonensis* (por via subcutânea). Após 10 semanas de infecção foram coletados fígado e baço para quantificar a carga parasitária por qPCR. Três ou mais experimentos independentes foram realizados em grupos contendo 3 a 7 camundongos..... 55
- Figura 8: Ensaio de imunofluorescência do epítipo α - Gal nas formas promastigotas de *L. amazonensis* (A) e *L. infantum* (B).** Nas figuras estão demonstradas marcação utilizando *Marasmus oreades* (MOA- FITC), marcação de núcleo e região do cinetoplasto (DAPI).

Estão sendo ilustradas fotomicroscopias com aumento de 100x (barra: 5µm)	59
Figura 9: Análise da marcação do α-Gal por citometria de fluxo em <i>L. amazonensis</i> (A), e <i>L. infantum</i> (B). Na figura estão representados análise comparativa em histograma da intensidade média de fluorescência (IMF) dos parasitos marcados com lectina MOA-FITC. Foi utilizado como controle parasitos não marcados como critério para delimitar a IMF. Os dados foram obtidos no citômetro FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA)	60
Figura 10: Identificação do epítipo α-Gal por ELISA em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i>. ELISA utilizando extratos proteicos de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i>, IgG anti α-Gal, e lectina MOA biotinilado como anticorpos primários (A). Foi realizado tratamento over night com α-galactosidase. (B). Foram usados como controles positivo e negativo Qβ α-Gal e Qβ Glicose, respectivamente, e a leitura foi feita 492nm O.D. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.	61
Figura 11: Análise da presença do epítipo α-Gal por Western Blot em extratos proteicos de formas promastigotas: 1) Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5%: (A) Padrão de peso molecular, (B) <i>L. amazonensis</i>, e (C) <i>L. infantum</i>. 2) Membrana de Western Blot: (D) Padrão de peso molecular (E) Controle positivo (extrato de carne de porco) (F) <i>L. amazonensis</i> (G) <i>L. infantum</i>.	62
Figura 12: Gel de poliacrilamida a 12 %, corado por Coomassie, das frações obtidas após purificação em coluna Lectina (MOA). (A) Padrão de peso molecular, (B, C) Eluído e eluente de <i>L. amazonensis</i> (D, E) Eluído e eluente de <i>L. infantum</i>. (F) Qβ-VLP contendo 540 moléculas do epítipo α-Gal ligadas (controle positivo)	63
Figura 13: Identificação do epítipo α-Gal em frações purificadas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> por ELISA: Foram analisados os extratos proteicos de <i>L. amazonensis</i> e de <i>L. infantum</i> (LTB), as frações ligadas a lectina (FL), e as frações não ligadas (FNL). O gráfico A mostra os resultados do ELISA com Lectina MOA e o gráfico B os resultados após tratamento com α-galactosidase, e a leitura foi feita a 492nm O.D.. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas.	64

Figura 14: Detecção de IgG anti α -Gal nos soros dos camundongos dos grupos *Knockout* para α -galactosiltransferase (α GalT-KO) (A) e grupos *wild type* (α GalT- WT) (B): ELISA realizado com pool de soros dos grupos infectados com *L. amazonensis*, com *L. infantum*, e o do grupo não infectado. Os soros foram coletados 7, 14 e 21 dias após a infecção. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por *(P<0.001) 66

Figura 15: Avaliação da carga parasitária no fígado e no baço dos animais dos grupos experimentais de camundongos C57BL/6 *Knockout* (α GalT-KO) e *wild type* (α GalT-WT) para α -galactosiltransferase, infectados por *L. amazonensis* (A) e por *L. infantum* (B): a carga parasitária foi determinada pela técnica de PCR quantitativa 67

Figura 16: Detecção de IgG anti α -Gal por ELISA nos soros dos camundongos imunizados: produção de anticorpos anti α -Gal pelos grupos imunizados α GalT-KO e α GalT-WT ao antígeno Q β - α Gal (A); ao antígeno Q β - α Glicose (B); produção de anticorpos anti α -Gal pelos grupos não imunizados α GalT-KO e α GalT-WT antígeno Q β - α Gal (C); ao antígeno Q β - glicose (D) 69

Figura 17: Avaliação da carga parasitária no fígado e baço dos animais dos grupos α GalT-KO imunizados com α -Gal e não imunizados, infectados por *L. amazonensis* (A), e por *L. infantum* (B): a carga parasitária foi determinada pela técnica de PCR quantitativa. (* p <0,05). Três ou mais experimentos independentes foram realizados nos grupos contendo 3 a 7 camundongos..... 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição dos grupos experimentais de camundongos C57BL/6 α GalT-WT e α GalT-KO.....	50
Tabela 2: Sequência de iniciadores <i>forward</i> e <i>reverse</i> , e tamanho do amplicon referente aos genes avaliados na pcr quantitativa.	52
Tabela 3: Composição dos grupos experimentais de camundongos C57BL/6 α GalT-KO imunizados e α GalT-KO não imunizados.	56

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA: Análise de variância
- BCA: Ácido Bicinconínico
- FACS - *Fluorecence Acitivated Cell Sorter*
- BSA: *Bovine serum albumin*
- CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
- DNA: *Deoxyribonucleic acid*
- DTT: dithiothreitol
- ECL: *Enhanced chemiluminescence*
- ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- FITC: *Fluorescein Isothiocyanate*
- GIPLs: Glicoinositol-fosfolípidos
- GP63: Glicoproteína
- GPI: Glicosilfosfatidinositol
- HIV: *Human immunodeficiency virus*
- IC: Intracardíaca
- ICB: Instituto de Ciências Biológicas
- ID: Intradérmica
- IFAT: Immunofluorescence Antibody Test
- IFN- γ : Interferon-gama
- IgA: Imunoglobulina da classe A
- IgE: Imunoglobulina da classe E
- IgG: Imunoglobulina da classe G
- IgM: Imunoglobulina da classe M
- IL-10: Interleucina 10
- IL-12: Interferon-gama
- IMF: Intensidade média de fluorescência
- iNOS: Óxido nítrico sintase indutível
- IP: Intraperitoneal
- KO: *Knockout*
- LC: Leishmaniose cutânea
- LCD: Leishmaniose cutânea difusa

- LCD: Leishmaniose Cutânea
- LCL: Leishmaniose cutânea
- LDPK: Leishmaniose Dérmica pós Kalazar
- LM: Leishmaniose Mucocutânea;
- LMC Leishmaniose mucosa/mucocutânea
- LPG: lipofosfoglicano
- LTA: Leishmaniose tegumentar americana
- LV: Leishmaniose visceral
- MOA: *Marasmus oreades*
- NF-k: Fator nuclear kapa B
- NNN: Novy, McNeal e Nicolle
- OMS: Organização mundial de saúde
- OPD: *Ortho-phenylenediamine*
- PBS: *Phosphate Buffer Saline*
- PCR: *Polymerase Chain Reaction*
- pH: Potencial hidrogeniônico
- qPCR: *Polymerase Chain Reaction quantitative*
- RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*
- VLP: *Virus like particule*
- RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta
- RNA: *Ribonucleic acid*
- ROS: Espécies reativas de oxigênio
- RPM: Rotação por minuto
- SC: Subcutânea
- SDS: Dodecil-Sulfato de Sódio
- SDS- PAGE: *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
- SINAN: sistema de agravo de notificação.
- TGF- β : Fator de Crescimento Tumoral-beta
- Th1: Resposta celular do tipo 1
- Th2: Resposta celular do tipo 2
- UDP- Gal: Uridina difosfato galactose
- UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
- WB: *Western blot*

- WHO: *World Health Organization*
- WT: *wild type*
- α -GalT: alpha galactosil transferase

RESUMO

As manifestações clínicas da leishmaniose são dependentes de uma complexa interação entre a espécie infectante e o sistema imune do hospedeiro. Carboidratos têm sido considerados essenciais para a virulência e viabilidade de *Leishmania spp.* Os glicoconjugados, secretados ou presentes na superfície do parasito, podem contribuir para a sobrevivência e proliferação deste após a evasão do sistema imune. A produção de anticorpos que reconhecem o carboidrato α -Gal já foi relatada em seres humanos infectados com *Leishmania infantum*, *L. major* e *L. tropica*. No Brasil, as espécies de *L. infantum* e *L. amazonensis* estão relacionadas as Leishmanioses Visceral e Tegumentar, respectivamente. Assim, este trabalho teve por objetivo verificar a presença do epítipo α -Gal nas cepas de *L. infantum* e *L. amazonensis*. O epítipo α -Gal acoplado ao vírus Q β (denominados Q β - α -Gal) foi explorado como vacina para leishmaniose experimental usando como modelo camundongos C57BL/6 *knockout* para α -Galactosiltransferase (α -GalT-KO), que mimetizam o hospedeiro humano na produção de anticorpos anti- α -Gal. O epítipo α -Gal foi identificado em maior proporção na superfície de *L. amazonensis* em comparação com *L. infantum*. Os camundongos α -GalT-KO infectados com 10^7 promastigotas das espécies de *L. amazonensis* e *L. infantum* apresentaram redução significativa da carga parasitária no baço e no fígado quando comparados com camundongos C57BL/6 *wild type* para α -Galactosiltransferase. Em seguida, camundongos α -GalT-KO foram vacinados com nanopartículas de Q β - α -gal e infectados com as espécies de *L. amazonensis* e *L. infantum*. A infecção e proliferação dos parasitos foram controladas eficientemente no baço e no fígado, não sendo detectados parasitos por PCR quantitativa. Assim, o epítipo α -Gal pode ser explorado como candidato vacinal contra as leishmanioses cutânea e visceral.

Palavras chaves: *Leishmania*; infecção experimental; epítipo α -Gal.

ABSTRACT

The clinical manifestations of leishmaniasis depend on a complex interaction between the parasite species and the host immune system. Carbohydrates have been pointed as essential for virulence and viability of *Leishmania* parasites. Secreted or on the parasite surface, Glycoconjugates may contribute for *Leishmania* survival and efficiently proliferate after immune system evasion.. The anti- α -Gal antibodies production has been reported in humans infected with *Leishmania infantum*, *L. major* and *L. tropica*. This study aimed to verify the presence of α -Gal epitope in strains of *L. infantum* and *L. amazonensis*. We explored the α -Gal epitope coupled to virus-like nanoparticles Q β , (named Q β - α -Gal) as vaccine in experimental leishmaniasis using C57BL/6 α -Galactosyltransferase knockout (α -GalT-KO) as a mouse model, which mimic human hosts in producing anti- α -Gal antibody. The α -gal epitope was identified in higher proportion on the surface of *L. amazonensis* in comparison to *L. infantum*. C57BL/6 α -GalT-KO mice infected with 10^7 promastigotes of both *Leishmania* species significantly decreased parasite load in the liver and slightly in the spleen, compared with *Leishmania* infection in mice C57BL/6 α -GalT-WT. C57BL/6 α -GalT-KO mice were also vaccinated with Q β - α -Gal nanoparticles and after parasite challenge, this group efficiently controlled the infection and proliferation of *Leishmania* parasites in the liver and spleen, where no *Leishmania* parasites were detected by qPCR. The α -Gal epitope emerges as a vaccine candidate to block both human cutaneous and visceral leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania*; experimental infection; α -Gal epitope;

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses compreendem um conjunto de doenças infecciosas causadas por protozoários da ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (Ross 1903). Esses parasitos são transmitidos a humanos e outros mamíferos após a picada de insetos dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, da Ordem Diptera, da Família Psychodidae e Sub-Família Phlebotominae (Ashford 2000).

A leishmaniose se manifesta por diferentes formas clínicas, e o que define qual forma clínica o indivíduo apresenta é um conjunto de fatores, tais como: a espécie de *Leishmania*, a capacidade imunitária do indivíduo, idade, estado nutricional, entre outros (Kevric et al. 2015). Assim, as leishmanioses são classicamente divididas em leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT), podendo ser causadas ao homem por cerca de 22 espécies do parasito (Who-Paho 2013). Nas Américas parece bem consolidado que a *L. (L.) infantum* é a espécie responsável pelos casos de leishmaniose visceral, e *L. (L.) amazonensis* uma das espécies associadas aos casos de leishmaniose tegumentar. Embora nos últimos anos diversos trabalhos tenham mostrado esforços crescentes para o desenvolvimento de vacinas e novas drogas para o controle efetivo da doença, as leishmanioses ainda são consideradas doenças negligenciadas e não existem vacinas eficazes disponíveis contra a doença humana (Costa et al. 2011; Kobets et al. 2012; Kevric et al. 2015).

O epítipo α -Gal é a denominação utilizada para o carboidrato com estrutura Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAcR, que é abundantemente expresso em glicoconjugados de mamíferos não primatas, prosímios e macacos do Novo Mundo. Em contraste, esse epítipo não é expresso em células de seres humanos e macacos do Velho Mundo, sendo estes considerados tolerantes ao epítipo- α -Gal na produção de anticorpos (Galili et al. 1987a e 1988; Macher & Galili 2008). Assim, baseado na produção de anticorpos anti- α -Gal, o α -Gal como antígeno tem sido explorado como alvo para imunoterapia em *Trypanosoma cruzi*, e recentemente em *Plasmodium spp* (Towbin et al. 1987; Gazzinelli et al. 1991; Travassos & Almeida 1993; Yilmaz et al. 2014). Ademais, a produção de anticorpos que reconhecem α -Gal já foi relatada em seres humanos infectados com *Leishmania infantum*, *L. major* e *L. tropica* (Ávila et al. 1988 e 1989; Al - Salem et al. 2014), mas ainda não há estudos que expliquem a participação desse epítipo nas leishmanioses.

Os modelos experimentais mais utilizados para o estudo das leishmanioses (camundongos e hamsters) não se assemelham aos humanos no contexto da expressão do epítipo α -Gal. Esses modelos possuem o gene que codifica a enzima α -1,3-galactosiltransferase (GT) ativo e, diferente dos humanos, expressam em suas células o

epítopo α -Gal (Galili & Swanson 1991; Galili 2015). Dessa forma, o uso de animais KO para a enzima GT justificou-se pela necessidade de um modelo experimental que, assim como os humanos, produzissem naturalmente anticorpos anti- α -Gal, mas que fossem incapazes de expressar o epítopo α -Gal no endotélio vascular e em outros tecidos (Thall et al. 1995; Tearle et al. 1996).

Nesse contexto, esse trabalho teve por objetivo, primeiramente, verificar a presença do epítopo α -Gal nas formas promastigotas de *Leishmania infantum* (MCAN/BR/2002/BH401) e *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) e avaliar a infecção experimental por essas espécies em camundongos C57BL/6 *knockout* para a enzima α -1,3-galactosiltransferase (α GalT-KO) e em camundongos C57BL/6 selvagens para essa enzima. Além disso, realizou-se também a imunização nos animais *knockout* com o epítopo α -Gal acoplado ao “*Virus Like Particle*” Q β (Q β - α -Gal), a fim de avaliar se ocorre proteção nesses animais quando infectados por *L. amazonensis* e *L. infantum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O gênero *Leishmania* e as leishmanioses

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à Família Trypanosomatidae, Ordem Kinetoplastida, Filo Sarcomastigophora e Sub-Reino Protozoa (Ross 1903; Laison & Shaw 1987). Esses parasitos são transmitidos após a picada de insetos fêmeas dos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo: América Latina) e *Phlebotomus* (Velho Mundo: Bacia do Mediterrâneo, Ásia e partes da África), da Ordem Díptera, da Família Psychodidae e Sub-Família Phlebotominae (Ashford 2000; Lainson & Shaw 1987). Existem em torno de 20 espécies de *Leishmania* e 30 espécies e subespécies de flebotomíneos implicados nas diferentes formas clínicas da doença humana, que tem também como fatores determinantes o status imunológico e as condições socioeconômicas (Reithinger R & Dujardin JC 2007; Antironi et al. 2012; Stockdale & Newton 2013).

O agente causador da leishmaniose foi primeiramente descoberto por Ross (1903), que denominou o gênero *Leishmania*. Lesões cutâneas, semelhantes às descritas por Ross, não eram associadas ao gênero *Leishmania*. Foi em 1909 que Lindenberg, Carini e Paranhos demonstraram formas amastigotas em lesões de pacientes com “Úlcera de Bauru”, em São Paulo, Brasil (Laison 2010).

Os subgêneros *Viannia* e *Leishmania* foram definidos anos depois por Lainson & Shaw (1978), utilizando como parâmetros o desenvolvimento do parasito no inseto vetor, o potencial de crescimento em meios de cultura e a virulência dos parasitos quando inoculados em animais experimentais. As espécies do subgênero *Viannia* foram caracterizadas por apresentarem baixo potencial de crescimento em meio de cultivo NNN convencional e por desenvolverem-se no intestino posterior do flebotomíneo. Já as espécies do subgênero *Leishmania* crescem mais facilmente em meio de cultivo NNN convencional e não se desenvolvem no intestino posterior do flebotomíneo (Lainson & Shaw 1987).

Existem diferentes propostas de classificação para as formas clínicas da doença. A Organização Mundial de Saúde (OMS) as classifica em quatro principais formas: leishmaniose visceral (LV), também conhecida como Kalazar; leishmaniose dérmica pós Kalazar (LDPK); leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LMC). Enquanto a leishmaniose cutânea é a forma mais comum, a leishmaniose visceral é a mais grave e pode ser fatal se não tratada (WHO 2016).

No ano de 1999, Mauricio e cols. relataram ser *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* indistinguíveis e formam um grupo monofilético, assim adotaremos neste trabalho a

denominação *L. infantum* (sinonímia de *L. (L.) chagasi*). A *L. infantum* está associada à leishmaniose visceral (LV) que é uma doença crônica grave, de alta letalidade em indivíduos não tratados, em crianças desnutridas, e também é considerada emergente em portadores de infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (Gontijo & Melo 2004; Murray et al. 2005). A LV no homem apresenta vários sinais clínicos, tais como febre, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, perda de peso e hipergamaglobulinemia (Marzochi 1994; Murray et al. 2005). Os cães são considerados os principais reservatórios do agente etiológico da LV zoonótica. Esse hospedeiro apresenta variações no quadro clínico da doença, existindo casos de animais assintomáticos e outros que podem chegar a estágios graves da doença. Assim, considerando o convívio do cão com o homem, aqueles desempenham um papel importante na transmissão da doença, pois, mesmo os que não são considerados doentes, são fontes de infecção de *Leishmania* para os flebotomíneos que, por sua vez, podem transmiti-la ao homem (Alvar et al. 1994; Molina et al. 1994; Abranches et al. 1998; Dias et al. 2011; Laurenti et al. 2013).

A leishmaniose cutânea é conhecida nas Américas como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (Brasil 2007), e apresenta um espectro de manifestações clínicas. As variações vão desde a leishmaniose cutânea localizada (LCL), que tende para a cura espontânea, até formas graves da doença como a leishmaniose mucosa/mucocutânea (LMC) e a cutânea difusa (LCD) (Silveira et al. 2004). A forma cutânea localizada (LCL) é considerada a forma mais comum da LT e é causada principalmente por *L. major* e *L. tropica* no Velho Mundo, e por *L. braziliensis*, *L. mexicana* e *L. amazonensis* no Novo Mundo (Garcez et al. 2002). A forma cutânea difusa (LCD) é considerada grave, sendo mais frequente no Novo Mundo, e é causada por *L. amazonensis*. A gravidade da forma difusa deve-se, principalmente, à dificuldade no tratamento das lesões (Convit et al. 1993; Ashford 2000; Murray et al. 2005).

Sobre a espécie *L. amazonensis*, classicamente associada às formas tegumentares de leishmanioses, alguns achados experimentais inesperados sugerem novas abordagens. Abreu-Silva e cols. (2004) demonstraram que camundongos BALB/c desafiados com *L. amazonensis* apresentaram manifestações patológicas similares às encontradas na leishmaniose visceral causada por *L. infantum*. Em um estudo realizado no município de Paracatu-MG, dentre os 15 cães diagnosticados clinicamente, por meio de testes sorológicos RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) e IFAT (Imunofluorescence Antibody Test), com leishmaniose visceral foi demonstrado que 5 estavam infectados por *L. amazonensis* (Dias et al. 2011). Em outro estudo, também com cães diagnosticados clinicamente com leishmaniose

visceral, foram encontrados cães infectados com *L. amazonensis* (Tolezano et al. 2007). Esses estudos indicam que a espécie *L. amazonensis* pode causar condições clínicas similares à leishmaniose visceral em cães.

2.2. O ciclo evolutivo

O ciclo evolutivo da *Leishmania* é originalmente zoonótico, possuindo mamíferos silvestres como reservatórios. Verifica-se atualmente uma adaptação para o ciclo urbano, principalmente devido ao crescente desmatamento, às mudanças climáticas e alterações no ecossistema do vetor. Esses fatores associados ao comprometimento imunológico do indivíduo e à falha terapêutica têm contribuído para a crescente expansão da doença observada nos últimos anos em humanos (Lainson & Rangel 2005; Shaw 2007; Reithinger & Dujardin 2007).

No hospedeiro invertebrado, o ciclo de vida do parasito ocorre quando uma fêmea de flebotomíneo se alimenta em um mamífero parasitado e ingere células do sistema fagocítico mononuclear contendo formas amastigotas. No tubo digestivo do flebotomíneo, as amastigotas se transformam em formas flageladas denominadas promastigotas procíclicas. Essas formas se multiplicam intensamente, e em cerca de 30 a 60 horas ocorre a transformação em formas alongadas denominadas nectomonas, que se aderem ao intestino médio do flebotomíneo. Nos parasitos do subgênero *Viannia*, acrescenta-se uma fase de divisão de paramastigotas ovoides e promastigotas, que se aderem às paredes do intestino posterior. Após a digestão do sangue ingerido, estas formas migram para a região torácica do intestino, onde se transformam em promastigotas metacíclicas. Estas formas são infectantes para o hospedeiro vertebrado e migram para o esôfago, faringe e probóscida do flebotomíneo (Lainson & Shaw 1978). O hospedeiro vertebrado é infectado quando, durante o repasto sanguíneo, as fêmeas hematófagas inoculam as formas promastigotas que serão fagocitadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear, onde ocorre a transformação para a forma amastigota, reiniciando o ciclo quando, por ventura, for picado por um flebotomíneo (Lainson & Rangel 2005) (Figura 1).

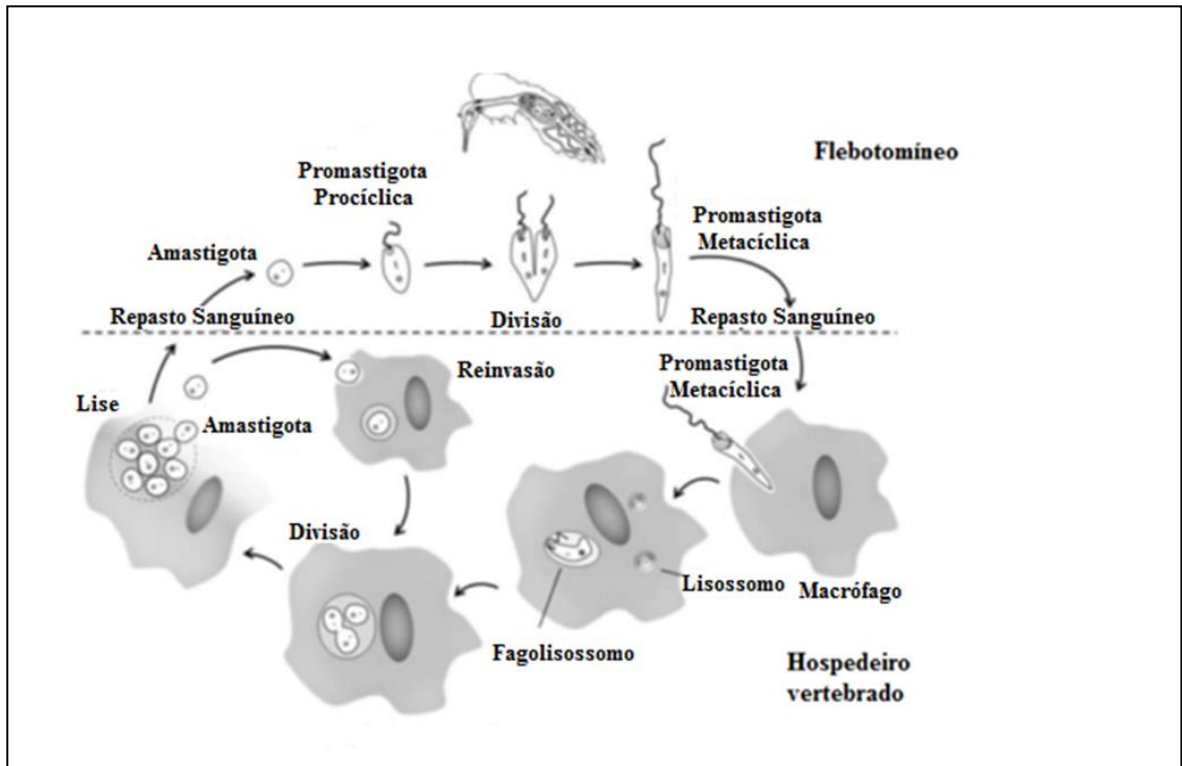


Figura 1: Ciclo evolutivo: representação esquemática do ciclo de vida de *Leishmania* sp. (adaptado de Assis et al. 2012).

As espécies de *Leishmania* apresentam diversos hospedeiros vertebrados mamíferos: canídeos, roedores, edentados (tatu, preguiça, tamanduá), marsupiais (gambá), quirópteros e primatas, incluindo o homem (Brazil 1987; Berzunza-Cruz et al. 2015). A maioria das leishmanioses são zoonóticas, com o homem infectando-se secundariamente. A forma antroponótica é causada por *L. donovani*, sendo encontrada apenas em alguns países do subcontinente Indiano e em partes da África (Alvar 2004; Ameen 2010).

2.3. A situação atual das leishmanioses

A epidemiologia das leishmanioses é considerada complexa devido a diversos fatores, tais como a variabilidade das espécies de *Leishmania* e dos hospedeiros e vetores envolvidos no ciclo de transmissão. Assim, ocorrem, além de diversas manifestações clínicas, diferenças na resposta terapêutica. Também deve ser considerado o fato de circularem diferentes espécies de *Leishmania* em uma mesma área geográfica (WHO 2016).

As figuras 2 e 3 ilustram a distribuição mundial das Leishmanioses Cutânea e Visceral, respectivamente. Podemos observar que o Brasil se destaca em ambos os mapas dentre os países que reportaram mais de 5000 casos no ano de 2013 (WHO 2016).

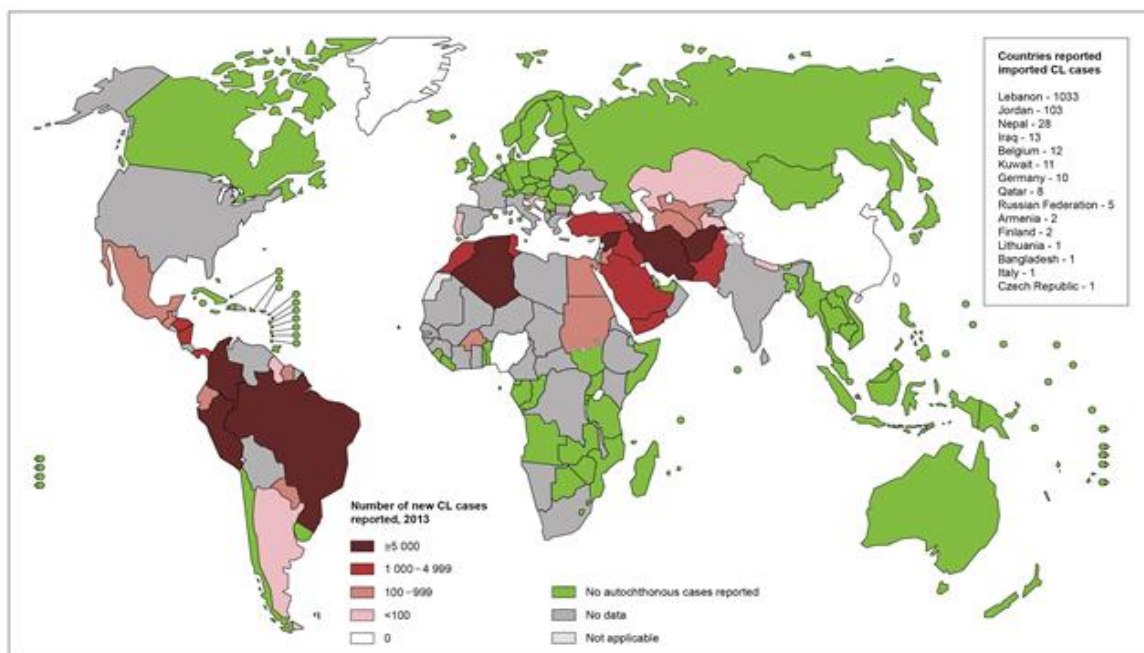


Figura 2: Distribuição mundial da Leishmaniose Cutânea: países ou áreas com risco de transmissão (Fonte: WHO Leishmaniasis control programme. Annual country reports, 2013)

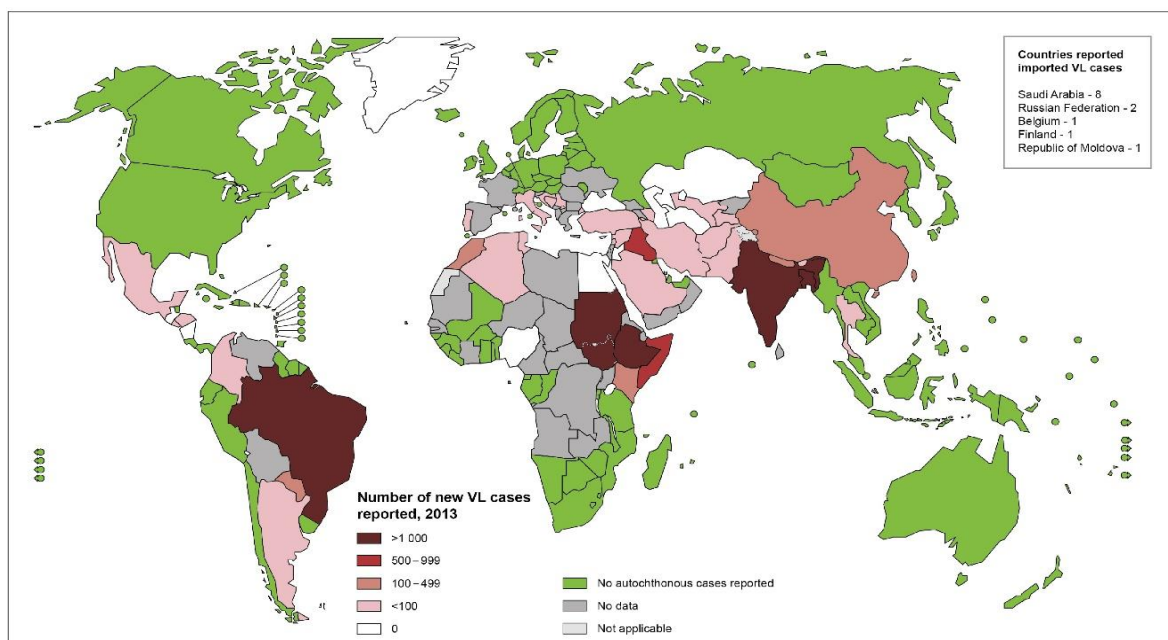


Figura 3: Distribuição mundial da Leishmaniose Visceral: países ou áreas com risco de transmissão (Fonte: WHO Leishmaniasis control programme. Annual country reports, 2013)

Em 2015, a Organização Mundial de Saúde (OMS), em colaboração com os programas o controle de leishmanioses, reuniu os dados dos 25 países mais acometidos com leishmanioses. Foram incluídos nesse relatório os países que reportaram mais de 100 casos de leishmaniose visceral (LV) e mais de 2.500 casos de leishmaniose cutânea (LC) em 2013. Dos 25 países selecionados, 13 representam 95 % dos casos de LV, e 11 representam 90 % dos casos de LC. O Brasil foi o único país incluído em ambos os grupos, sendo reportados 3.453 casos de LV e 19.402 casos de LC. Estima-se que 556 milhões de pessoas estejam em áreas sob risco de adquirir a infecção para LV e 399 milhões para LC (WHO 2016).

2.4. Aspectos gerais da interação parasito/hospedeiro

Nas leishmanioses, acredita-se que sejam inoculadas naturalmente pela picada, durante o repasto sanguíneo do flebotômio, no hospedeiro mamífero cerca de 1.000 formas promastigotas de *Leishmania* durante o repasto sanguíneo da fêmea infectada (revisado por Mougneau et al. 2011).

De forma geral, o controle da infecção por *Leishmania* é realizado inicialmente pelos componentes da resposta imune inata. Entretanto, uma resposta mais específica, formada pela imunidade adaptativa, também é necessária. Os linfócitos T têm papel fundamental na infecção por *Leishmania*, e são observados no linfonodo drenante cerca de 16 horas pós-infecção (Malherbe et al. 2000).

O paradigma clássico de diferenciação das células TCD4+ como marcador da polarização da resposta imune (Th1 ou Th2) não se aplica a todas espécies de *Leishmania*, principalmente às espécies das Américas, sendo frequente a ocorrência de perfis mistos (WHO 2016). Espécies de *Leishmania* associadas à LT normalmente exigem um padrão de resposta imune do tipo Th1 para a cura em modelos murinos (Wilson et al. 2005). Já nas espécies causadoras de LV, a dicotomia do perfil de resposta imune Th1 e Th2 não é evidente em modelos murinos (Ahmed et al. 2003). O perfil Th17 também tem sido estudado e parece estar associado ao agravamento de lesões causadas pela IL-17 em camundongos suscetíveis infectados com *L. major* (Lopez Kostka et al. 2009).

Comumente, no modelo murino infectado por *L. infantum*, o perfil de resposta Th1, considerado como protetor, é reprimido pela produção de citocinas como IL-10 e TGF- β , estando a suscetibilidade mais relacionada à incapacidade de desenvolvimento de uma resposta Th1 efetiva do que com a elaboração de uma resposta Th2 exacerbada (Miralles et al. 1994). Já foi demonstrado que *L. infantum* afeta diretamente seu microambiente local com a

produção de TGF- β de modo a suprimir a atividade leishmanicida dos macrófagos parasitados por tal espécie (Wilson et al. 2005).

Na infecção por *L. amazonensis*, a resistência e a suscetibilidade não são estritamente relacionadas com o desenvolvimento de uma resposta Th1 e Th2, respectivamente. Muitos fatores parecem estar associados com a suscetibilidade à *L. amazonensis*. Em primeiro lugar, o parasito é capaz de inibir a maturação de células dendríticas e subsequente produção de IL-12 por estas células (Boggiatto et al. 2009), o que pode inibir uma resposta do tipo Th 1 (Ji J et al. 2002). Surpreendentemente, foi demonstrado que o IFN- γ tem um papel ambíguo durante a infecção de macrófagos com *L. amazonensis in vitro*, dependendo da concentração da citocina, que pode causar a morte ou o crescimento do parasito (Qi H et al. 2004). O parasito desenvolveu estratégias adaptadas para escapar das defesas do hospedeiro, incluindo a ativação do complexo repressor do NF- $\kappa\beta$, que suprime a expressão de iNOS por macrófagos infectados, favorecendo a infecção (Qi H et al. 2004). Além disso, já foi demonstrado que na infecção por *L. amazonensis* é necessária uma quantidade muito elevada de óxido nítrico e superóxido, para que ocorra a morte de amastigotas dentro do macrófago (Mukbel et al. 2007; Calegari-Silva et al. 2009).

No sítio da infecção, as células dendríticas e os macrófagos residentes na pele são as primeiras células a participarem da produção de uma resposta do hospedeiro (Mougneau et al. 2011). As células dendríticas são eficazes na apresentação de antígenos e produzem citocinas como a IL-12, que possibilitam a polarização das células T para um perfil Th1, considerado protetor em leishmanioses (Von Stebut et al. 1998 e 2003). Já foi demonstrado em modelo murino a capacidade dessas células de fagocitar a *Leishmania* minutos após a inoculação (Ng et al. 2008). Os macrófagos, por sua vez, no caso das espécies de *Leishmania*, são, por um lado, indispensáveis para a sobrevivência, divisão, e replicação do parasito; por outro, são as principais células do sistema imune responsáveis por sua eliminação (Liu & Uzonna 2012). Os principais mecanismos microbicidas de macrófagos contra microrganismos intracelulares são a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (Podinovskaia & Descoteaux 2015).

Os neutrófilos também desempenham papel importante no processo de infecção da *Leishmania*. Já foi demonstrado, em infecção experimental por *L. major*, que em menos de uma hora após a infecção já se observa um infiltrado de neutrófilos na orelha dos camundongos infectados. Os autores concluíram que uma pequena quantidade de macrófagos é infectada nos estágios iniciais, havendo um predomínio de neutrófilos infectados. Após alguns dias, esse cenário se inverte, ocorrendo diminuição da população de neutrófilos infectados e aumento da de macrófagos, que são, afinal, as células hospedeiras de longo

tempo do parasito (Peters et al. 2008). Embora os neutrófilos fagocitem facilmente as formas inoculadas de *Leishmania*, eles acabam favorecendo a sua proliferação ao entrarem em apoptose, pois uma das estratégias do parasito é utilizar células apoptóticas como “vetor”, assim, os macrófagos fagocitam os neutrófilos apoptóticos contendo parasitos vivos (Van Zandbergen et al. 2004; Ribeiro-Gomes & Sacks 2012).

Os diversos eventos envolvidos na interação das formas evolutivas de *Leishmania* com seus hospedeiros são bastante complexos e podem ser considerados, em conjunto com os mecanismos de escape desenvolvidos pelo parasito, como fatores determinantes para o desenvolvimento da doença.

2.5. Principais moléculas presentes na superfície de *Leishmania*

A participação de diversas moléculas é bastante estudada nas diferentes espécies de *Leishmania* e tem sido associada à interação, sobrevivência e virulência do parasito na célula hospedeira. Os glicoconjugados desempenham um papel fundamental, estando relacionados a diversos eventos durante a interação parasito/hospedeiro, que modulam funções importantes das células do hospedeiro (Descoteaux & Turco 1999; Turco 2003; Assis et al. 2012).

A forma promastigota de *Leishmania* possui em sua superfície o glicocálice, composto, em sua maioria, de moléculas que são fixadas por âncora de glicosilfosfatidinositol (GPI). Entre as moléculas ancoradas por GPI, destacam-se o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína (GP63) (McConville & Ferguson 1993; Späth et al. 2003). Essas moléculas são capazes de interagir diretamente com células do hospedeiro, facilitando sua internalização (Brittingham et al. 1995; Ueno & Wilson 2012).

O LPG é um heteropolímero formado principalmente por unidades repetitivas de Gal β 1,4Man α 1-4-PO $_4^-$ ancorados via GPI. Diversas funções têm sido atribuídas ao LPG, tais como: proteção do parasito contra o ataque do sistema complemento (Puentes et al. 1990); inibição da apresentação de antígenos nos eventos iniciais modulados pelas células dendríticas (Liu & Uzonna 2012); inibição da maturação do fagossoma (Dermine et al. 2005) e indução da formação de redes extracelulares de neurófilo (Guimaraes-Costa et al. 2009). É importante ressaltar que a estrutura do LPG muda durante a diferenciação das formas infectantes promastigotas procíclicas em metacíclicas (Sacks et al. 1995; Soares et al. 2005). Além disso, ocorre polimorfismo estrutural entre espécies de *Leishmania*. Em *L. infantum*, as unidades de repetição de LPG apresentam a adição de β -Glc ao carbono C3 (Soares 2002; Assis et al. 2012).

A GP63 é uma glicoproteína com 63 kDa. Descoberta na década de 80, foi descrita como o antígeno de superfície mais abundante em formas promastigotas de *Leishmania* (Schneider et al. 1992 e 1994). Uma das funções importantes está relacionada à inativação da molécula C3b, inibindo a formação da C5 convertase e facilitando a fagocitose (Brittingham et al. 1995).

Uma família de glicolípídeos denominada glicoinositol-fosfolípídeos (GIPLs) está presente em todos os estágios de vida do parasito, localizando-se na superfície celular e revestindo estruturas intracelulares de *Leishmania* (McConville & Ferguson 1993). A função dos GIPLs ainda precisa ser melhor esclarecida. Polimorfismos estruturais dos GIPLs são bem caracterizados, sendo classificados como GIPLs do tipo I, GIPLs tipo II, e híbridos. GIPLs do tipo I são a forma predominante nas espécies em *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica* e *Leishmania aethiopica*, e apresentam, em sua maioria, um resíduo de manose como açúcar mais distal, que é identificado pela adição ao sexto carbono da manose proximal de um resíduo de manose (Man α 1-6Man α 1-4GlcN-PI) (McConville & Blackwell 1991; Schneider et al. 1994). Já os GIPLs do tipo II possuem como característica a adição ao terceiro carbono da manose proximal de um resíduo de manose (Man α 1-3Man α 1-4GlcN-PI), e já foram descritos em *L. major*, *L. mexicana* e *L. panamensis* (McConville & Ferguson 1993). GIPLs do tipo III compartilham características estruturais com os dois primeiros tipos e possuem adição de uma manose em ambos os terceiro e sexto carbonos da manose proximal (Man α 1-3(Man α 1-6)Man α 1-4GlcN-PI) encontrados em *L. mexicana* e *L. donovani* (McConville & Ferguson 1993).

Apesar da diversidade de funções apresentadas por glicoconjugados presentes na superfície da *Leishmania* na interação parasito/hospedeiro, essas moléculas têm grande importância e influenciam diretamente no estabelecimento da infecção e no tipo de resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro.

2.6. O epítipo α -Gal.

O epítipo α -Gal é a denominação utilizada para o carboidrato com estrutura Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R (Figura 4), que é abundantemente expresso em glicoconjugados de mamíferos não primatas, prosímios e macacos do Novo Mundo. Em contraste, esse epítipo não é expresso em células de seres humanos e macacos do Velho Mundo, sendo estes considerados tolerantes ao epítipo α -Gal na produção de anticorpos (Galili et al. 1987a e 1988; Macher & Galili 2008).

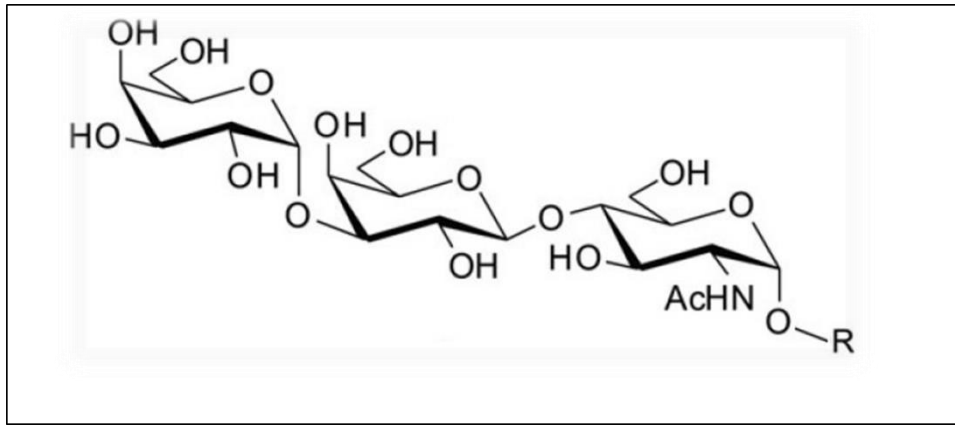


Figura 4: Ilustração do epítipo α -Gal (Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc R). (Adaptado Schocker et al. 2016)

A enzima α -1,3-galactosiltransferase (α -GalT), por processo de glicosilação, sintetiza dentro do aparelho de Golgi cadeias de glicoproteínas, glicolipídeos e proteoglicanos que apresentam os epítipos de α -Gal (Basu e Basu 1973; Blake e Goldstein 1981; Betteridge e Watkins 1983; Blanken & Van den Eijnden 1985; Galili et al. 1988 e 2013). Essa enzima liga a galactose fornecida pelo açúcar, Uridina difosfato galactose (UDP-Gal), para o radical N-acetil glicosamina (Gal β 1-4GlcNAc-R) para gerar o epítipo α -Gal, como representado na figura 5.

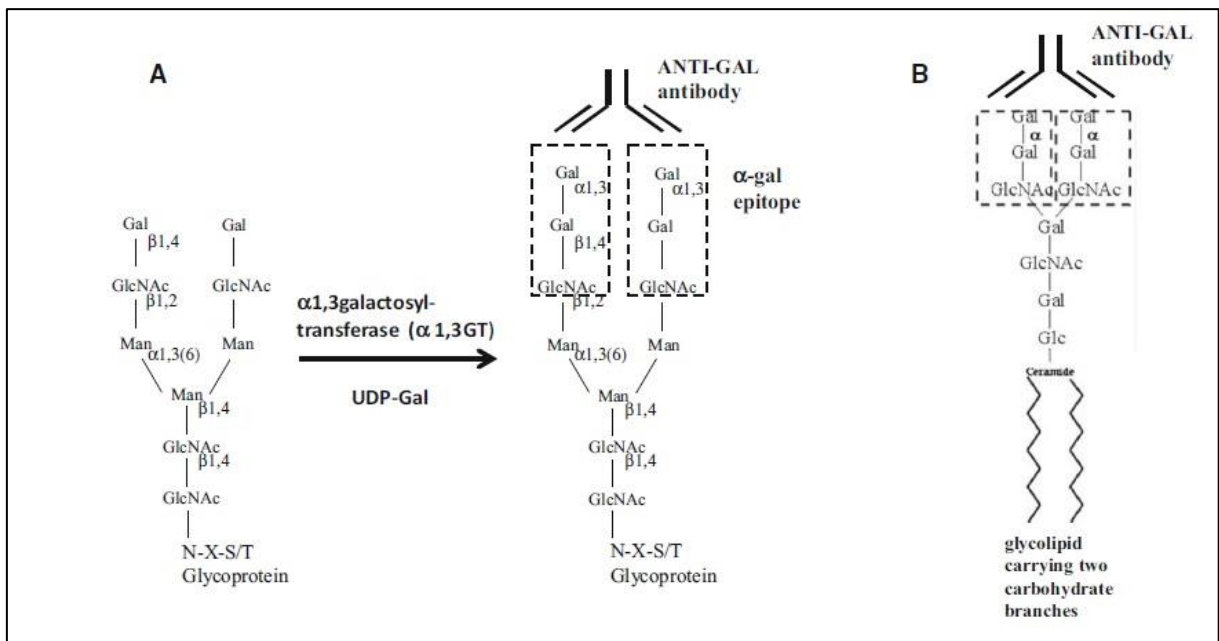


Figura 5: Ilustração de epítipos de α -Gal (marcados por retângulos por linhas tracejadas) em glicoproteínas (A) e em glicolipídeos (B). A figura mostra também o local de ligação do anticorpo anti-Gal (Galili 2015).

Um estudo comparativo da ocorrência de anticorpos anti- α -Gal *versus* a expressão do epítopo α -Gal foi realizado utilizando eritrócitos e soros de um grande número de primatas (macacos do Velho e do Novo Mundo e humanos) e de mamíferos não primatas (coelho, ratos, porcos, cães e bovinos). Foi observado um padrão evolutivo distinto, no qual o anticorpo anti- α -Gal estava presente em macacos do Velho Mundo e em seres humanos, e o epítopo α -Gal nos macacos do Novo Mundo e nos mamíferos não primatas. Assim, eles concluíram que a expressão do α -Gal foi evolutivamente conservada em macacos do Novo Mundo e nos mamíferos não primatas, e suprimida em linhagens ancestrais dos primatas do Velho Mundo. A supressão desse epítopo foi acompanhada da produção de anticorpos anti- α -Gal, verificada nos soros dos humanos e dos macacos do Velho Mundo (Galili et al. 1987b).

A hipótese mais aceita para explicar a inativação do gene GGTA1 que codifica a enzima α 1,3-galactosiltransferase é que tenha ocorrido há aproximadamente 28 milhões de anos uma pressão seletiva mediada por um patógeno endêmico na Eurásia e África, onde as populações de primatas que não expressavam o epítopo α -Gal e, conseqüentemente, produziam anti- α -Gal tenham sido favorecidas. Possivelmente, as populações favorecidas foram capazes de utilizar o anticorpo anti- α -Gal como mecanismo de defesa a patógenos que expressavam o α -Gal (Galili e Swanson 1991; Galili 2015). Após ter sido eliminado o epítopo α -Gal, esses primatas passaram a produzir grandes quantidades de anticorpos contra esse epítopo, sendo considerados anticorpos naturais de anti- α -Gal (Galili et al. 1987b e 1988; Galili e Swanson 1991; Koike et al. 2002 e 2007).

A presença do epítopo α -Gal já foi descrita em vários agentes patogênicos como, por exemplo, em vírus envelopados e bactérias dos gêneros *Klebsiella*, *Salmonella*, *Streptococcus*, e *E. coli* (Luderitz et al. 1965; Galili et al. 1988; Posekany et al. 2002; Han et al. 2012). Também protozoários dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* foram reportados por apresentarem cadeias de carboidratos com estruturas semelhantes ao epítopo α -Gal (Avila et al. 1989; Almeida et al. 1991; Schneider et al. 1994; Ramasamy & Field 2012).

Assim, os estudos envolvendo o epítopo α -Gal têm ganhado importância devido à possibilidade de aplicações clínicas, uma vez que o aumento da produção de anticorpos anti- α -Gal pode estar envolvido com diversos mecanismos imunológicos.

2.6.1. Anticorpos anti- α -Gal

Galili e cols. (1993) mostraram que o anticorpo anti- α -Gal é um dos anticorpos produzidos naturalmente em seres humanos, representando aproximadamente 1% da produção de IgG circulante reagindo com este antígeno. Também são encontrados como isotipos IgM,

IgE e IgA. Ao longo da vida, esses anticorpos são produzidos como resultado da contínua estimulação antigênica causada pelos carboidratos presentes nas bactérias gastrointestinais da microbiota normal (Galili et al. 1988).

Em algumas doenças parasitárias, estudos mostram que a produção de anticorpos anti- α -Gal está relacionada com a presença do epítopo α -Gal no agente etiológico. Na Doença de Chagas, foi demonstrado que anticorpos anti- α -Gal se ligam ao α -Gal presente no *Trypanosoma cruzi* e induzem lise mediada pelo complemento do parasito, sugerindo que anticorpo anti- α -Gal contribua para a proteção do hospedeiro (Towbin et al. 1987; Gazzinelli et al. 1991; Pereira Chioccola et al. 2000). Em *Plasmodium spp* o epítopo α -Gal também foi identificado, e a produção de anticorpo anti- α -Gal foi associada à proteção da doença (Yilmaz et al. 2014).

A produção de anticorpos que reconhecem α -Gal já foi relatada também em pacientes com leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea. Em 1988, Avila e cols. detectaram altos níveis de anticorpos anti- α -Gal em crianças com leishmaniose visceral ativa e em adultos clinicamente curados. A doença era causada nesses pacientes pela espécie *L. donovani*. Em outro estudo, foram detectados níveis elevados de anticorpos IgG anti- α -Gal em pacientes infectados com *L. major* e *L. tropica* quando comparados a indivíduos saudáveis (Amen et al. 2014). Em pacientes infectados com espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, como *L. mexicana* e *L. braziliensis*, também foram encontrados níveis elevados de anticorpos anti- α -Gal (Avila et al. 1988 e 1989). Apesar desses relatos, ainda não foi bem estabelecida a presença do epítopo α -Gal em espécies de *Leishmania*.

A expressão anormal de epítopos α -Gal em tecidos humanos foi descrita também como um dos desencadeadores de processos autoimunes na Doença de Graves (Etienne-Decerf et al. 1987). Outro envolvimento importante de anticorpos anti- α -Gal é na rejeição aguda a xenotransplantes em humanos de órgãos de mamíferos que expressam o α -Gal, principalmente em órgãos de porcos. Este anticorpo funciona como uma barreira para o xenotransplantes, pois a ligação anti- α -Gal aos epítopos α -Gal irá mediar a rejeição imune. Esta barreira tem sido superada pela geração de animais *Knockout* para α -1,3-galactosiltransferase (α GalT-KO) (Phelps et al. 2003; Kuwaki et al. 2005; Lai et al. 2002)

Nessa perspectiva, devido a sua abundância nos seres humanos, anticorpos anti- α -Gal podem ter diversas aplicações clínicas e vários estudos têm sido realizados, tais como: vacinas modificadas para expressar o epítopo α -Gal podem ter a imunogenicidade aumentada (Abdel-Motal et al. 2007); tratamento de câncer por vacinas intratumorais contendo o epítopo α -Gal (LaTemple et al. 1999; Galili et al. 2010a e 2011); aplicação de nanopartículas de α -Gal em

feridas, visando o recrutamento e ativação de macrófagos para uma rápida cicatrização de feridas (Galili et al. 2010b).

2.7. Modelos experimentais para o estudo das leishmanioses

A investigação dos aspectos básicos das doenças em humanos pode ser dificultada ou inviabilizada por fatores, tais como: problemas de ordem ética, tamanho da amostra, uso de grupo controle, tipo de tratamento e uso de procedimentos invasivos, sendo a utilização do modelo animal experimental de fundamental importância para o conhecimento da doença (Fagundes & Taha 2004).

A maioria dos estudos com animais experimentais utiliza o modelo classificado como induzido – quando a condição/doença a ser investigada é induzida experimentalmente (Monteiro R. et al. 2009). A escolha do modelo adequado baseia-se em diversos fatores, tais como semelhanças clínicas, fisiológicas e imunológicas com o hospedeiro, capacidade em manifestar a doença e permitir estudos por um longo período, além da disponibilidade e facilidade de manejo animal (Hommel et al. 1995; Awasthi et al. 2004; Oliveira et al. 2005; Garg & Dube 2006).

Há estudos das leishmanioses em diversos modelos como cães, coelhos, cobaias, macacos, camundongos e hamsters. Porém, devido à facilidade de manejo, os camundongos e os hamsters têm sido os mais utilizados (Hommel et al. 1995; Oliveira et al. 2011). A evolução das leishmanioses em animais experimentais depende de diversos fatores, tais como: a cepa utilizada, a via de inoculação, o estágio evolutivo do parasito utilizado bem como o tamanho do inóculo (Kaye et al. 2004; Garg & Dube 2006; Sacks et al. 2015).

2.7.1. O modelo murino C57BL/6

Dentre os modelos experimentais utilizados para o estudo das leishmanioses, o camundongo é o mais comumente utilizado e o mais conhecido cientificamente. A taxonomia é definida como: classe Mammalia, ordem Rodentia, família Muridae, gênero *Mus*, espécie *Mus musculus*. Embora essa seja a classificação mais aceita, há controvérsias quanto às espécies e subespécies criadas em laboratórios devido à presença de alguns genes ou até mesmo cromossomos de espécies diferentes, como é o caso da linhagem C57BL/6, na qual 6,5% do genoma é originário de *Mus spretus*, e não de *Mus musculus* (Franco 2006).

Características biológicas como o ciclo de vida relativamente curto, similaridade genética a humanos e facilidade em terem seu genoma manipulado fazem com que eles se destaquem como bons modelos experimentais (Leon 2005).

Vários estudos possibilitaram o conhecimento genético de camundongos. Atualmente, a classificação genética das espécies se baseia nos programas de acasalamento utilizados. Quando estes ocorrem entre irmãos, a linhagem é denominada de isogênica (*inbred*), e quando ocorrem ao acaso, heterogênica (*outbred*), fazendo existir, assim, camundongos muito bem definidos geneticamente. São exemplos de linhagens isogênicas de camundongos: BALB/C; C57BL/6; DBA/1 e C3H/HeJ (Andrade 2002).

Os camundongos C57BL/6 foram originalmente obtidos por Clarence Little, em 1920, como parte de seu trabalho de produção de linhagens isogênicas. Após 20 gerações de acasalamentos consanguíneos, o resultante codificado com o número 57 foi denominado C57BL/6. As letras C e BL representam o homocigoto dominante para a cor da pelagem preta (*black*), e o número 6 refere-se à sexta linhagem que sobreviveu a pressão de endogamia. Esta linhagem apresenta animais de vida longa e com baixa suscetibilidade a tumores, entretanto é um background permissivo para a expressão máxima da maioria das mutações. São empregados como modelo *in vivo* no estudo de diversas áreas, tais como biologia cardiovascular, biologia do desenvolvimento, diabetes e obesidade, genética, imunologia, neurobiologia, oncologia e biologia comportamental, além de serem comumente utilizados no desenvolvimento de animais transgênicos (Beamer et al. 1996; Waterston et al. 2002).

As espécies de *L. donovani* e *L. infantum*, causadoras da forma visceral, e as espécies relacionadas às formas tegumentares, *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana* e *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, são capazes de infectar camundongos e de reproduzirem aspectos clínicos da doença em humanos, possibilitando o uso desses animais como modelos para avaliar o curso e controle da infecção, além da resposta imune (Alexander e Bryson 2005; Coelho et al. 2016). Abreu-Silva e cols. (2004) mostraram visceralização de *L. amazonensis* e desenvolvimento de doença sistêmica grave em camundongos C57BL/6.

Em relação às infecções por espécies causadoras da forma tegumentar, a inoculação de grande quantidade de parasitos (10^4 a 10^7) pela via subcutânea na pata continua a ser o modelo preferido para a infecção, porém a inoculação pela via intradérmica na orelha também tem sido utilizada por refletir melhor a infecção natural (Sacks et al. 2015). Já as espécies relacionadas à forma visceral, as vias sistêmicas (intraperitoneal e intracardíaca) são as mais utilizadas juntas com altas doses de parasitos, mas as vias subcutâneas e intradérmicas mostraram melhores resultados para o estabelecimento da infecção inicial (Ahmed et al. 2003; Ribeiro-Gomes et al. 2012).

O modelo murino de infecção por *L. major*, proposto por Sacks e cols. (2002), definiu o paradigma Th1/Th2 de resistência/suscetibilidade à leishmaniose cutânea. Quando animais da linhagem C57BL/6 são infectados com *L. major*, eles são capazes de controlar a infecção, sendo esse perfil de resistência associado ao desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1 (Louis et al. 1998). Entretanto, camundongos suscetíveis da linhagem BALB/c, quando infectados por *L. major*, apresentam doença progressiva e visceralizante, sendo essa suscetibilidade associada ao perfil de citocinas do tipo Th2 (Scott & Scharton 1994; Louis et al. 1998).

Em contraste com a infecção por *L. major*, a maior parte das linhagens de camundongos são suscetíveis a *L. amazonensis*, incluindo a C57BL/6, que apresenta lesões crônicas. Na infecção por *L. amazonensis*, a resistência e a suscetibilidade não são estritamente relacionadas com o desenvolvimento de uma resposta Th1 e Th2, respectivamente. Muitos fatores parecem estar associados com a suscetibilidade, como a capacidade do parasito de inibir a maturação de células dendríticas e subsequente diminuição na produção de IL-12, que pode impedir o desenvolvimento de uma forte resposta Th1 (Terabe et al. 1999; Ji J et al. 2002; Boggiatto et al. 2009). Surpreendentemente, foi demonstrado que o IFN- γ tem um papel ambíguo durante a infecção de macrófagos com *L. amazonensis in vitro*, a depender da concentração da citocina, que pode causar a morte ou o crescimento do parasito (Qi H et al. 2004).

Em um estudo com camundongos BALB/c, C57BL/6 e DBA/2, infectados experimentalmente com *L. amazonensis*, foi observada uma severa infecção sistêmica nos camundongos, com exceção da linhagem DBA/2, que apresentou uma forma leve da doença com auto cura. Esses dados sugerem que o espectro da doença depende de fatores genéticos do camundongo (Abreu-Silva et al. 2004).

Em relação à via de inoculação, um estudo com camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *L. infantum* comparou as vias intracardíaca e intradérmica (orelha) e observou disseminação do parasito para o baço e o fígado em ambas. Para a inoculação pela via intracardíaca, o inóculo continha 10^5 e 10^8 parasitos, e para a via intradérmica 10^9 (Ahmed et al. 2003).

Camundongos da linhagem C57BL/6 são também considerados como bons modelos para testes vacinais da LV (Garg e Dube 2006). Além disso, estudos mostram que, em relação à resposta imune humoral nesses modelos, a presença de linfócitos B e de anticorpos podem contribuir para a morbidade da doença, por meio da produção de IL-10 e de imunoglobulinas da classe IgG e IgM (Deak et al. 2010; Ronet et al. 2010).

A disponibilidade e a facilidade de manuseio dos camundongos e a suscetibilidade dos mesmos para a LV tem feito desses animais os mais utilizados nos modelos experimentais (Carrión et al. 2006).

2.7.2. O modelo C57BL/6 *knockout* para α 1,3-galactosiltransferase (α GalT-KO)

A enzima α -1,3-galactosiltransferase (α GalT) catalisa a síntese do carboidrato com a estrutura Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R, denominada “epítipo α -Gal”. Com exceção de seres humanos e primatas não humanos do Velho Mundo, todos os outros mamíferos, incluindo os camundongos, expressam glicanos α -Gal em suas células e tecidos (Galili et al. 1987a e 1987 b; Galili 1991).

A produção de animais *knockout* para a enzima se justifica pela necessidade de um modelo experimental que se assemelhasse aos humanos no contexto da expressão do epítipo α -Gal. Foram produzidos porcos e camundongos α GalT-KO que, assim como os humanos, produzem naturalmente anticorpos anti- α -Gal, mas são incapazes de expressar o epítipo α -Gal no endotélio vascular e em outros tecidos (Thall et al. 1995; Tearle et al. 1996). Os camundongos selvagens para α GalT-WT apresentam o gene GGTA1 funcional e expressam α -Gal em glicoconjugados presentes na superfície das células, suprimindo a produção de anticorpos anti α -Gal (Milland et al. 2006).

Os camundongos utilizados para a produção do *knockout* são da linhagem C57BL/6, homocigotos para o alelo nulo, não diferem em tamanho e aparência dos tipos selvagens, e são compatíveis para o desenvolvimento uterino normal. A ausência de expressão do α -Gal foi confirmada por ensaios usando anticorpos anti- α -Gal humano e também por análises de expressão de RNA (Millan et al. 2006).

O epítipo α -Gal foi explorado recentemente em *Plasmodium spp* e a produção de anticorpos anti- α -Gal foi avaliada em animais experimentais (Yilmaz et al. 2014). Nesse estudo foram utilizados camundongos C57BL/6 α GalT-KO e foi verificada proteção na malária experimental.

Nessa perspectiva, foram produzidos também camundongos α GalT-KO como modelo de vacinas. Os animais α GalT-KO, quando desafiados com vírus contendo o epítipo α -Gal, apresentaram proteção bem mais acentuada do que quando imunizados com o vírus sem o epítipo (Abdel-Motal et al. 2007). Além disso, esses animais são também de interesse para o estudo de imunogenicidade do epítipo α -Gal, podendo ser avaliada a produção de anticorpos anti- α -Gal, assim como o papel desses após imunização (Abdel-Motal et al. 2009 e 2010).

Camundongos α -GalT-KO foram utilizados também como modelo para o estudo de câncer, em que foi observada maior imunogenicidade nos tumores estimulados a expressarem o epítipo α -GalT (LaTemple et al. 1999; Galili et al. 2010a). O uso de nanopartículas contendo α -Gal foi testada nesses animais α -GalT-KO e foi observada otimização da cicatrização em queimaduras de pele (Galili et al. 2010b).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

- Avaliar a participação do carboidrato α -Gal na infecção experimental por *Leishmania amazonensis* e *L. infantum* em camundongos C57BL/6 *knockout* para α -1,3-galactosiltransferase (α 1,3- GalT-KO).

3.2. Objetivos Específicos:

- Identificar a presença do epítopo α -Gal em *L. amazonensis* e *L. infantum*.
- Avaliar a produção de anticorpos IgG anti- α -Gal por camundongos C57BL/6 selvagens (α GalT-WT) e *Knockout* para α -galactosiltransferase (α GalT-KO), infectados por *L. amazonensis* e *L. infantum* em diferentes tempos de infecção.
- Avaliar a produção de anticorpos anti- α -Gal, da classe IgG, no soro dos animais experimentais previamente estimulados com epítopo α -Gal acoplado ao “*Virus Like Particle*” Q β (Q β - α -Gal).
- Realizar imunizações com o epítopo α -Gal nos camundongos α GalT-KO e avaliar a proteção contra as infecções por *L. amazonensis* e *L. infantum*.
- Quantificar a carga parasitária no baço e fígado dos animais experimentalmente infectados com *L. amazonensis* e *L. infantum*.

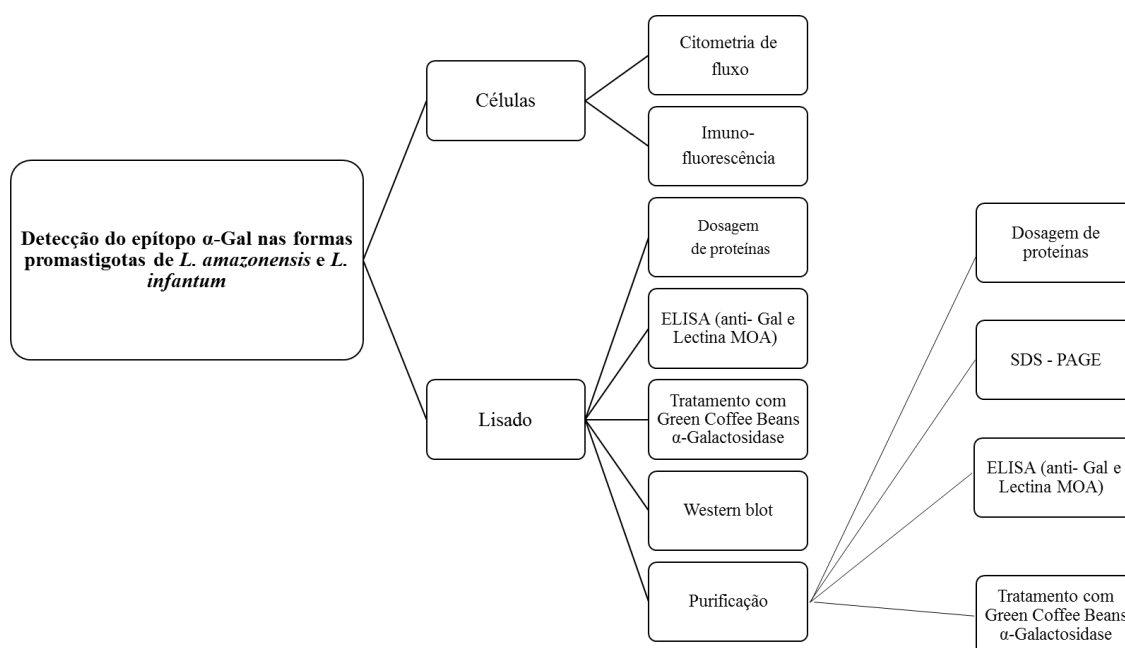
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Fase 1: Detecção do epítipo α -Gal nas formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*

Inicialmente, foram realizados ensaios com parasitos obtidos do cultivo *in vitro* de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Foram avaliadas a marcação do epítipo α -Gal por lectina MOA (*Marasmius oryzae*) FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*), por citometria de fluxo e imunofluorescência. Em seguida, foi realizada a extração de proteínas totais das formas promastigotas das duas espécies. As proteínas foram dosadas e foram realizados ensaios com esses lisados totais, também visando a identificação do epítipo α -Gal. Os ensaios realizados foram: *Western Blot* e ELISA com anticorpo primário anti- α -Gal, e para o teste de especificidade da ligação do ELISA as amostras foram tratadas previamente com Green Coffee Beans α -Galactosidase (Sigma Aldrich).

Em um segundo momento, as proteínas extraídas foram purificadas por cromatografia de afinidade, em coluna de lectina MOA, a fim de se obter apenas as frações que continham o epítipo carboidrato Gal α -1,3-Gal e Gal α -1,3-Gal β 1,4-GlcNac. Para confirmação da purificação, foram realizados ELISA com frações purificadas, usando MOA biotinizada e anticorpo primário IgG anti- α -Gal. Especificidade foi conferida pelo tratamento com α -Galactosidase.

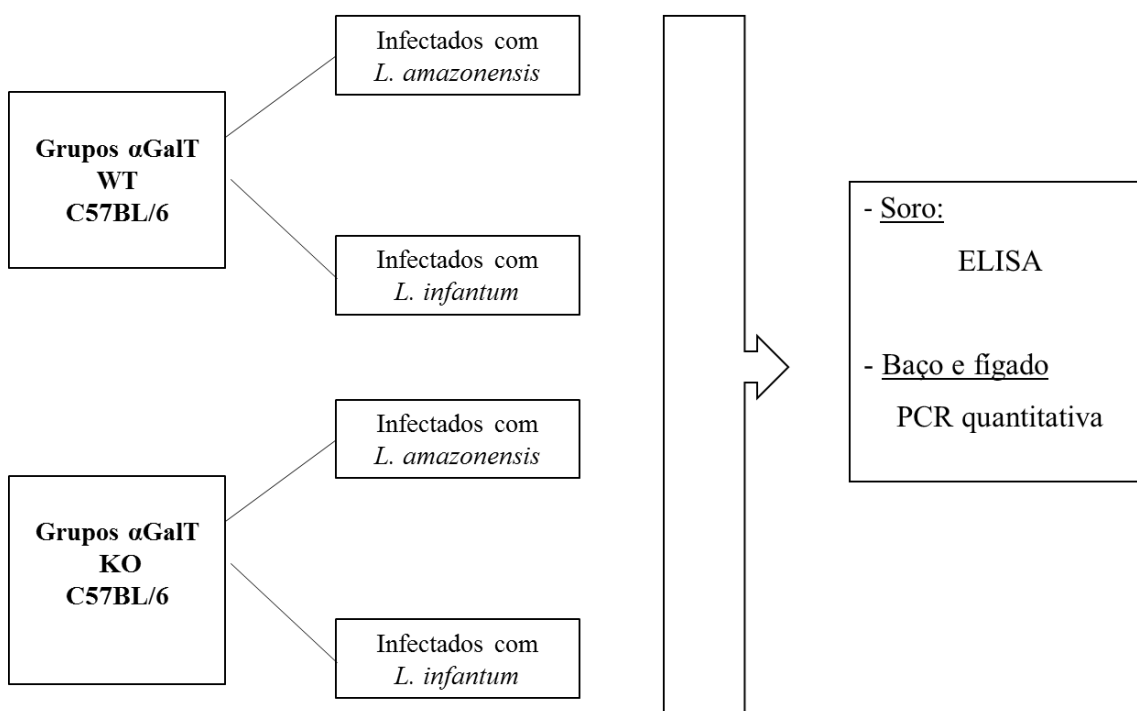
Fluxograma 1: Delineamento experimental da fase 1.



4.2. Fase 2: Infecções experimentais

Na segunda fase desse trabalho, grupos de camundongos C57BL/6 selvagens (α GalT-WT) e *Knockout* para α -galactosiltransferase (α GalT-KO) foram infectados experimentalmente pelas espécies de *L. amazonensis* e *L. infantum*, com o objetivo de comparar a evolução da infecção nos animais por as essas espécies de *Leishmania*, e avaliar a produção de anticorpos anti- α -Gal por esses animais. Foram coletadas amostras de sangue com 7, 14 e 21 dias após a infecção; ELISA com os soros dos camundongos foram testados usando o carboidrato α -Gal acoplado ao Q β - como antígeno. Novamente, tratamentos com a enzima α -Galactosidase foram realizados para o teste de especificidade. Os animais foram eutanasiados após 10 semanas de infecção, e foram coletados baço e fígado para avaliação da carga parasitária por PCR quantitativa.

Fluxograma 2: Delineamento da fase 2

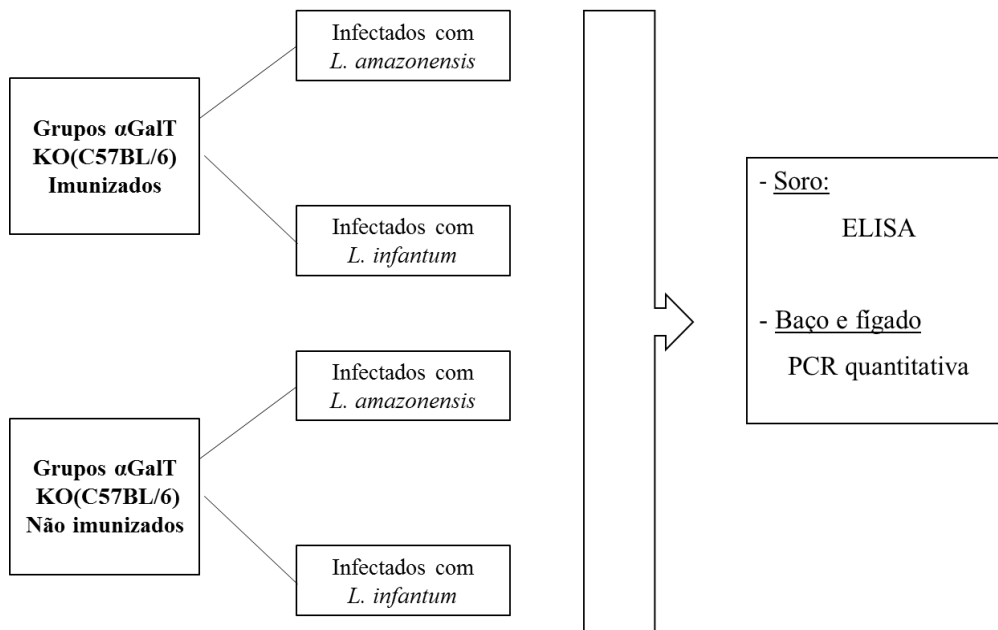


4.3. Fase 3: Imunizações com α -Gal acoplado ao Q β “Virus Like Particle” (Q β - α -Gal)

Na terceira fase, os camundongos α -GalT-KO foram estimulados com o epítipo α -Gal acoplado ao Q β “Virus Like Particle” (Q β - α -Gal), e foi avaliada a produção de anticorpos anti- α -Gal. Em seguida, os animais foram desafiados com infecções experimentais por *L. amazonensis* e *L. infantum* pelas vias subcutânea e intraperitoneal respectivamente, em grupos

de camundongos KO imunizados e KO não imunizados para comparar o desenvolvimento da infecção e a produção de anti- α -Gal. Foi avaliada a carga parasitária por PCR quantitativa em órgãos como baço e fígado dos animais, e também ELISA para verificar a produção de anticorpos IgG anti- α -Gal.

Fluxograma 3: Delineamento da Fase 3.



5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Metodologia utilizada na fase 1:

5.1.1. Obtenção das formas promastigotas

No presente estudo foram utilizadas formas promastigotas das cepas de referência PH8, *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) e BH401 *Leishmania infantum* (MCAN/BR/2002/BH401). Inicialmente os parasitos foram isolados de hamsters (*Mesocricetus auratus*) com 2 meses infectados experimentalmente. Promastigotas de *L. amazonensis* foram isoladas de lesão no focinho e de *L. infantum* de fragmentos do baço, em meio NNN (Novy, McNeal e Nicolle), com *Schneider's* (Sigma Aldrich) completo, suplementado com 2% de urina, 1 % de solução de vitaminas (BME Vitamins 100 X – Sigma Aldrich), 1% de L-glutamina (200 mM), 10 % de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco®). As culturas foram mantidas em estufa biológica BOD à temperatura de 23 °C ± 1 °C. Após expansão das culturas das células promastigotas, estas foram criopreservadas em uma solução contendo meio *Schneider's* (Sigma Aldrich), 10 % de Glicerol e 20 % de SFB, e depositadas no banco de cepas em nitrogênio líquido do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos – LFIH, do Departamento de Parasitologia da UFMG, sendo utilizadas em futuros experimentos deste projeto. Foi realizada a tipagem dos parasitos para a confirmação dessas espécies por PCR/RFLP, conforme descrito por Schönian et al. (2003).

5.1.2. Ensaio de imunofluorescência de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*

Formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, em fase estacionária (3 mL de cultura contendo 2×10^7 de parasitos), foram centrifugadas a 2000 x g, por 10 min, a 4 °C, lavadas três vezes com 5 mL de tampão PBS, ressuspensas em 150 µL de paraformaldeído a 2 % em PBS, e foram mantidas a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, os parasitos foram lavados 5 vezes, ressuspensos em 1 mL de PBS 1 X e foram depositados 10 µL em cada poço delimitado em lâmina de vidro durante 16 horas. As células fixadas foram reidratadas com 50 µL de PBS 1 X e bloqueadas com 30 µL de 5 % de soro fetal bovino em PBS por 90 minutos em câmara úmida. Após retirada da solução de bloqueio, a marcação dos terminais α-Gal foi feita com 2 µg/mL de Lectina MOA-FITC, que foi incubado por 90 minutos em câmara úmida. As lâminas foram lavadas por 4 vezes com solução de bloqueio e o núcleo e o cinetoplasto dos parasitos foram corados com 1 µg/mL de DAPI (Life

Technologies, Carlsbad, EUA) por 5 min a temperatura ambiente. Após cinco lavagens com PBS 1 X, as lâminas foram montadas com o reagente Mowiol (Dabco, Sigma Aldrich a 2,3 %) e cobertas por uma lamínula. Imagens foram obtidas com o microscópio de fluorescência Nikon Eclipse Ti. Este ensaio foi realizado em colaboração com os Professores Ricardo Gazinelli e Caroline Junqueira, no laboratório de Imunopatologia do do Centro de Pesquisas René Rachou-FIOCRUZ.

5.1.3. Citometria de fluxo

Formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, em fase estacionária, foram obtidas e centrifugadas a 2000 x g por 10 min a 4 °C, lavadas uma vez com tampão PBS 7,4 [NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na₂HPO₄ 1,4 g; KH₂PO₄ 0,2 g; H₂O qsp 1L] e ressuspensas novamente em PBS. Em seguida, os parasitos foram incubados com lectina MOA (*Marasmius oreades*), marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC), com 100-200 µg/mL, por 10 minutos em estufa a 37 °C. Lectina MOA-FITC marca especificamente Gal α 1,3Gal e Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc na superfície dos parasitos. Após a incubação, os parasitos foram lavados duas vezes com PBS, e ressuspensos em 200 µL de PBS, sendo finalmente quantificados por Citometria de Fluxo. Os dados foram obtidos no citômetro FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA). O experimento foi realizado em duplicata, e para cada amostra foram adquiridos dados referentes a cinquenta mil eventos para realização da análise quantitativa. Os dados foram analisados no software FlowJo, versão X.0.7 (Tree Star Inc., Ashland, EUA). Nesta etapa foi realizada análise comparativa em histograma da intensidade média de fluorescência (IMF) dos parasitos marcados. Foi utilizado como controle, parasitos não marcados, como critério para delimitar a IMF. Este ensaio foi realizado em colaboração com os Professores Ricardo Toshio Fujiwara e Daniella C. Bartholomeu no Laboratório de Imunol Genômica de Parasitos do ICB-UFMG.

5.1.4. Extração de proteínas totais

Os antígenos solúveis totais foram preparados a partir de 1×10^8 formas promastigotas obtidas, conforme descrito no **item 5.1.1.** Os parasitos foram centrifugados a 2000 x g, por 10 min, e lavados duas vezes com tampão PBS e ressuspensos em 3 mL de tampão de lise [20 mM Hepes, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 250 mM sacarose, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF e 300 µL coquetel inibidor de protease (GE Healthcare, Piscataway, EUA)], submetidos a 5 ciclos de congelamento (N₂ líquido) e descongelamento (42 °C). Em seguida, os extratos

foram submetidos a centrifugação a $8000 \times g$ durante 20 min, a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -70 °C (Fernandes et al. 2008).

5.1.5. Dosagem de proteínas

As amostras de proteínas foram dosadas pelo método colorimétrico do Ácido Bicinconínico (BCA), utilizando o kit “*BCA Protein Assay Reagent*” (Thermo Scientific, Waltham, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

5.1.6. ELISA para o epítipo α -Gal

Para identificação do epítipo α -Gal nos extratos de proteínas totais de *L. amazonensis* e *L. infantum* foram utilizados como anticorpos primários lectina *Mushroom Marasmius oreades* (MOA) biotinilado (EY Laboratories, USA), e também anticorpos IgG anti- α -Gal purificados.

Placas de ELISA (NUNC, Thermo Scientific, EUA) foram sensibilizadas com os extratos de proteínas totais diluídos em tampão de carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9,5 na concentração de 2,5 μ g/ μ L, 50 μ L por poço. Os antígenos Q β - α -Gal e Q β Glc foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente, na concentração de 5 μ g/ μ L. A sensibilização das placas ocorreu por 16-18 horas, a 4° C. Em seguida foi realizado o bloqueio com solução de BSA a 2 % (Sigma Aldrich), em PBS, pH 7,4, por 50 minutos, a 37°C. Após o bloqueio, as placas foram vertidas para retirada do excesso da solução. As placas revestidas com os antígenos foram sequencialmente incubadas com lectina MOA, e com anticorpos purificados IgG anti- α -Gal (diluição 1:100) por 90 minutos, com anti IgG humano biotinilado (diluição 1: 4000) e estreptavidina (diluição 1:300), por 30 minutos. Todos os passos de incubação foram realizados a 37°C. As lavagens das placas foram realizadas 5 vezes após cada etapa de incubação com solução (PBS 1X, pH 7, 4 e 0,05 % de Tween 20) e, em seguida, secas por inversão em papel absorvente. A solução cromógena utilizada foi obtida pela solubilização de tabletes contendo OPD (OPD Tablets, Sigma Aldrich), e foi feita a incubação das placas por 30 minutos, no escuro, fazendo-se a interrupção da reação com o acréscimo de solução de ácido sulfúrico a 4 N. Por fim, foi feita a leitura em espectrofotômetro em 492 nm (MultiskanGo™ ThermoScientific).

5.1.7. Tratamento com *Green Coffee Beans* α -Galactosidase

Para verificar a especificidade da ligação foi realizado o tratamento pela enzima α -galactosidase - *Green coffee beans* (Sigma Aldrich). Foram adicionados 10 U/mL da enzima (50 μ L por well) e deixados a 28 °C por 10 horas. Após a incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com solução (PBS 1X, pH 7,4 e 0,05 % de Tween 20), e os demais passos do ELISA foram realizados conforme protocolo descrito no item anterior.

5.1.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

As amostras obtidas nos ensaios de extração de proteínas totais dos parasitos foram submetidas à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% [gel principal: Bis-acrilamida 30 %, Tris 1,5 M, SDS 10 %, APS 10%, TEMED 0,1 %; gel stack: Bis-acrilamida 30%, Tris 0,5M, SDS 10%, APS 10%, TEMED 0,1%]. Foram adicionados às amostras o tampão de amostra (SDS 10 %, Tris-HCl 0,5 mM pH 6,8, azul de Bromofenol 1 %, 2- β -mercaptoetanol 5 % e glicerol 10 %), e essas misturas foram pré-aquecidas durante 10 minutos para desnaturação das proteínas e, posteriormente, aplicadas no gel para separação eletroforética. A eletroforese foi realizada utilizando tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 % e pH 8,3) sob a voltagem de 70 V por 15 minutos e a 100 V até o fim da corrida. Após a corrida, os géis foram corados por incubação por 12-16 horas com a solução de *Coomassie Blue* (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,25 %, metanol 50 % e ácido acético 10 %) e, em seguida, descorados em solução etanol 30 % e ácido acético 10 %, segundo Neuhoff e cols. (2005).

5.1.9. Western Blot

O *Western Blot* foi realizado utilizando como antígenos os extratos brutos de *L. infantum* e *L. amazonensis*, IgG anti- α -Gal de humanos purificados como anticorpos primários e anti IgG humano biotilado como anticorpo secundário. Como controle positivo para o antígeno α -Gal foi utilizado extrato de carne de porco, que expressa grande quantidade de epitopos α -Gal.

Para padronização do ensaio foram avaliadas diferentes concentrações dos antígenos (20 e 40 μ g), diferentes diluições do anticorpo primário (1/50, 1/100, 1/200), e do anticorpo secundário (1/3000, 1/2500, 1/2000), sendo que as melhores condições obtidas foram: 20 μ g dos antígenos; anticorpo primário na diluição de 1/100, e anticorpo secundário na diluição de 1/3000.

Foram confeccionados géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12 % e aplicados 20 µg dos antígenos em cada canaleta. Esses géis correram a 70 volts por 15 minutos e a 100 volts até o fim da corrida. Em seguida, foram transferidos para membranas de nitrocelulose, que foram incubadas com tampão de bloqueio (BSA a 3 % em PBS) a 4 ° C, por 16-18 horas. Os anticorpos primário e secundário foram diluídos no tampão de bloqueio e foram incubados com as membranas por 1 hora em temperatura ambiente, separadamente e em sequência. Após cada incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes com solução de lavagem (PBS 1X, Tween 0,5 %) por 10 minutos. A revelação foi desenvolvida com substrato ECL (Thermo Scientific) e suas imagens foram digitalizadas com um *ImageScanner* (Amersham Biosciences).

As massas moleculares das bandas foram obtidas usando o software (<http://www.gelalyzer.com>) e padrão de peso molecular *BlueEye Prestained Marker* (10-245 KDa) (Jena Biosciences).

5.1.10. Purificação de proteínas contendo α-Gal por cromatografia de afinidade

As amostras obtidas no ensaio de Extração de Proteínas totais foram aplicadas em uma coluna de lectina - "*Lectin Individual Gel Kit*" (EY Laboratories, INC., San Mateo, CA). A coluna foi previamente lavada duas vezes com PBS 1 X (Fosfato 0,01 M - NaCl 0,15 M, pH 7,2 - 7,4). A eluição foi realizada por meio da adição do tampão PBS contendo 0.2 M Galactose. Em seguida, as frações eluídas, contendo Galα1,3Gal e Galα1,3Galβ1,4GlcNAc, foram dosadas conforme ensaio descrito no **item 5.1.5**. Todas as frações obtidas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 %, conforme metodologia descrita no **item 5.1.8**. Também foi avaliada a presença do epítipo α-Gal por ELISA utilizando anti α-Gal purificado e lectina MOA como anticorpos primários, e confirmada a especificidade por Tratamento com *Green Coffee Beans* α-Galactosidase, conforme descrito nos **itens 5.1.6 e 5.1.7**.

5.2. Metodologia utilizada na fase 2:

5.2.1. Animais

O trabalho foi submetido e aprovado pela comissão de ética em uso animal (CEUA) da UFMG (255/2013), sendo os animais mantidos e manipulados de acordo com os critérios desse comitê.

Foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus*, da linhagem isogênica C57BL/6, sendo alguns *knockout* para o gene GGTA1, que codifica a enzima α -1,3 Galactosiltransferase, e outros selvagens para esse gene. Todos machos, com idade de 8 semanas, e peso variando entre 18 e 22 gramas. Os camundongos não passaram por qualquer privação alimentar ou hídrica, recebendo ração comercial específica para a espécie e água *ad libitum*, e foram mantidos em caixas de polipropileno forradas com marvalha e alocadas em uma estante ventilada, localizada no biotério do Departamento de Parasitologia da UFMG.

Os animais usados nesse trabalho foram cedidos pelo Prof. Peter Cown, diretor do ST Vincent Hospital, Melbourne Austrália, e Prof. Kim Janda, Scripps Research Institute, La Jolla, California.

5.2.2. Preparação dos inóculos

Para obtenção das formas promastigotas de *Leishmania* das referidas espécies em fase estacionária de crescimento, a cultura foi expandida em meio *Schneider's* (Sigma Aldrich), suplementado com 2 % de urina, 1 % de solução de vitaminas (BME Vitamins 100 X – Sigma Aldrich), 1% de L-glutamina (200 mM), 10 % de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina (Gibco®), a partir do descongelamento das formas promastigotas anteriormente criopreservadas, sendo realizadas repiques semanais nesse meio. A curva de crescimento foi feita para determinar a fase logarítmica e estacionária de cada cepa, sendo a contagem dos parasitos feita utilizando a câmara de Neubauer.

Os inóculos para infecção dos camundongos foram preparados utilizando parasitos de 2^a passagem e em fase estacionária, sendo a cultura lavada 3 vezes por 5 min a 3.000 g e ressuspensas em PBS 1 X (Tampão Salina Fosfato) estéril com volume final necessário para inocular 10 μ L de *L. amazonensis*, e 200 μ L de *L. infantum* por animal, em uma concentração de 1×10^7 promastigotas.

Todos os animais foram infectados com a mesma quantidade de promastigotas (10^7 por animal). Os grupos da via subcutânea tiveram inóculos com volume final de 10 μ L, e os da via intraperitoneal com de 200 μ L. No grupo não infectado utilizado como controle, inoculou-se PBS 1 X estéril pelas duas vias, 10 μ L pela via subcutânea e 200 μ L pela via intraperitoneal.

5.2.3. Grupos experimentais

5.2.3.1 Grupos *wild type* para α -1,3 galactosiltransferase (α GalT-WT)

Os camundongos que compõem esse grupo são da linhagem C57BL/6 e são selvagens para o gene que codifica a enzima α -1,3 galactosiltransferase (α GalT-WT). São provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, e foram alocados em grupos de acordo com a espécie de *Leishmania* utilizada na infecção, como mostra a tabela a seguir.

5.2.3.2. Grupos *Knockout* para α -1,3 galactosiltransferase (α GalT-KO)

Os camundongos que compõem este grupo são da linhagem C57BL/6 e são *knockout* para o gene GGTA1, que codifica a enzima α -1,3-galactosiltransferase (α GalT-KO) (Thall et al., 1995; Milland et al., 2006). Foram gentilmente cedidos pelo o Prof. Dr. Peter Cowan, diretor do Sant Vincent Hospital, Austrália. Os animais foram alocados em grupos de acordo com a espécie de *Leishmania* utilizada na infecção, como mostra a tabela a seguir.

Tabela 1: Composição dos grupos experimentais de camundongos C57BL/6 α GalT-WT e α GalT-KO

GRUPO (n = 3-5)	VIA (volume inoculado)	INÓCULO (10⁷ promastigota)
KO	IP/ 200 μ L	<i>L. infantum</i>
KO	SC/ 10 μ L	<i>L. amazonensis</i>
KO	IP/SC	Solução salina
WT	IP/ 200 μ L	<i>L. infantum</i>
WT	SC/ 10 μ L	<i>L. amazonensis</i>
WT	IP/SC	PBS 1 X

5.2.3.3. Procedimentos de coleta de sangue e de órgãos

A coleta de amostras de sangue foi realizada após administração, por via intraperitoneal, de anestésico quetamina e xilazina dose de 30 mg/kg de peso. Foi feita punção por via submandibular com auxílio de uma lanceta descartável, e tubo *ependorf* de 1,5mL sendo coletados aproximadamente 200µL por vez. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm para separação do soro, armazenadas a -20 °C e, posteriormente, foram utilizadas para a detecção IgG anti- α -gal, pelo método de ELISA.

Baço e fígado foram coletados durante o procedimento de necropsia dos animais após 10 semanas de infecção. Em cada animal foi administrado quetamina e xilazina (30 mg/kg) e, após estarem completamente anestesiados, foi realizado o deslocamento cervical. Os órgãos foram removidos de forma asséptica e foram devidamente identificados e armazenados a -80 °C para posterior realização do ensaio de PCR quantitativa.

5.2.3.4. Avaliação sorológica por ELISA

Amostras de sangue dos animais infectados e dos grupos controles foram coletadas e o soro destes animais foi utilizado para dosagem de anticorpos IgG anti- α -Gal. A partícula de Q β - α Gal foi utilizada como antígeno na placa, e Q β -Glucose foi usado como antígeno controle. O anticorpo secundário empregado foi anti IgG de camundongo biotilado. Os soros dos animais experimentais foram utilizados nas diluições de 1/100, 1/200 e 1/400. Como controles positivos e negativos, utilizamos, respectivamente, *pool* de soros de pacientes chagásicos (altos títulos de anti- α -Gal) e *pool* de soros de camundongos WT não infectados.

Os procedimentos do ensaio foram os mesmos descritos anteriormente no **item 5.1.6.** da **fase 1**, mudando apenas o antígeno e anticorpo utilizados.

5.2.3.5. Avaliação da carga parasitária tecidual de *L. amazonensis* e *L. infantum* por PCR quantitativa (qPCR)

Optamos por avaliar a carga parasitária no baço e no fígado dos animais, por serem os órgãos viscerais mais comumente acometidos nas leishmanioses. A carga parasitária foi avaliada pela técnica de PCR quantitativa. Estão descritos a seguir os ensaios de extração de DNA, os iniciadores utilizados e o desenvolvimento da qPCR.

5.2.3.5.1.Extração de DNA

Foram utilizados os baços e os fígados dos animais experimentais obtidos durante a necropsia. A coleta dos órgãos foi feita em cada animal separadamente, na capela de fluxo laminar para garantir a ausência de contaminação. Os órgãos foram coletados inteiros, e armazenados a -80 ° C. Cada órgão foi triturado e homogeneizado com auxílio de bisturi, e em seguida pesado, obtendo-se fragmentos de aproximadamente 25 µg. Essas amostras foram transferidas para tubos tipo *eppendorf* previamente identificados, e submetidas à extração de DNA utilizando o kit “*Genomic DNA from tissue*” (Macherey-Nagel, Duren, Germany) de acordo com as recomendações do fabricante. Em todas as amostras, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop ND 2000 Thermo Scientific).

5.2.3.5.2. Iniciadores utilizados na PCR-quantitativa

Para avaliar a carga parasitária nos órgãos analisados foi utilizado um gene específico para *Leishmania infantum* (DNA polimerase α), que é um gene de cópia única (Gene DB- Lin J . 16.1640). O par de *primers* utilizados amplifica um fragmento de 90 pb (acesso no GenBank: AF009147), conforme descrito por Bretagne e cols. (2001). O gene de camundongo (β actina), que é expresso de forma constitutiva, também foi utilizado como normalizador da reação. As sequências de iniciadores *forward* e *reverse*, e tamanhos do *amplicon* referentes aos genes avaliados para análise da expressão gênica por PCR quantitativa estão descritos na tabela a seguir.

Tabela 2: Sequência de iniciadores *forward* e *reverse*, e tamanho do amplicon referente aos genes avaliados na PCR quantitativa.

Gene	Sequência de nucleotídeos (5' → 3')	Tamanho do amplicon (pb)
DNA polimerase α F R	TGT CGC TTG CAG ACC AGA TG GCA TCG CAG GTG TGA GCA C	90
β actina F R	TCA TTG TAG AAG GTA TGG TGC CAG AGA AAG AGA GGC ATC C	104

5.2.3.5.3. PCR quantitativa

Para cada fragmento de tecido avaliado, a presença de *L. amazonensis* e de *L. infantum* foi verificada utilizando 1 µL dos iniciadores *forward* e *reverse* de cada gene na concentração de 2 µM, 5 µL de Sybr Green PCR Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, EUA) e 4 µL de cDNA (5 ng/µL), com água Ultrapura (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil), perfazendo um volume final de 10 µL de reação. O ensaio foi realizado em triplicata para todos os genes, sendo as expressões do gene constitutivo (β actina de camundongo) e do gene específico para *Leishmania* (DNA polimerase- α) avaliadas na mesma placa. Os valores de *baseline* e *threshold* utilizados foram ajustados para 3 a 15 ciclos e 0,2, respectivamente. A quantificação dos genes foi feita nas condições termociclagem de 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos, no equipamento ABI PRISM 7500 (PE Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os dados foram expressos e normalizados por meio da construção da curva padrão, utilizando como calibrador amostras de esplenócitos com valores conhecidos de *L. infantum*, e como controle endógeno o gene constitutivo de camundongo β actina. As curvas de dissociação dos iniciadores estão demonstradas no anexo 2 e demonstram a eficiência dos iniciadores na amplificação da sequência de DNA analisada.

5.3. Metodologia utilizada na fase 3:

5.3.1. Imunizações

Para as imunizações, foram utilizados o epítipo α -Gal acoplado ao bacteriófago Q β -VLP (virus-like particles) denominado de Q β - α Gal. Utilizamos o vírus acoplado a 540 partículas de α -Gal, preparado como mostrado na figura X que foram preparados como descrito anteriormente (Hong et al. 2009; Strable & Finn 2009; Fiedler et al. 2010).

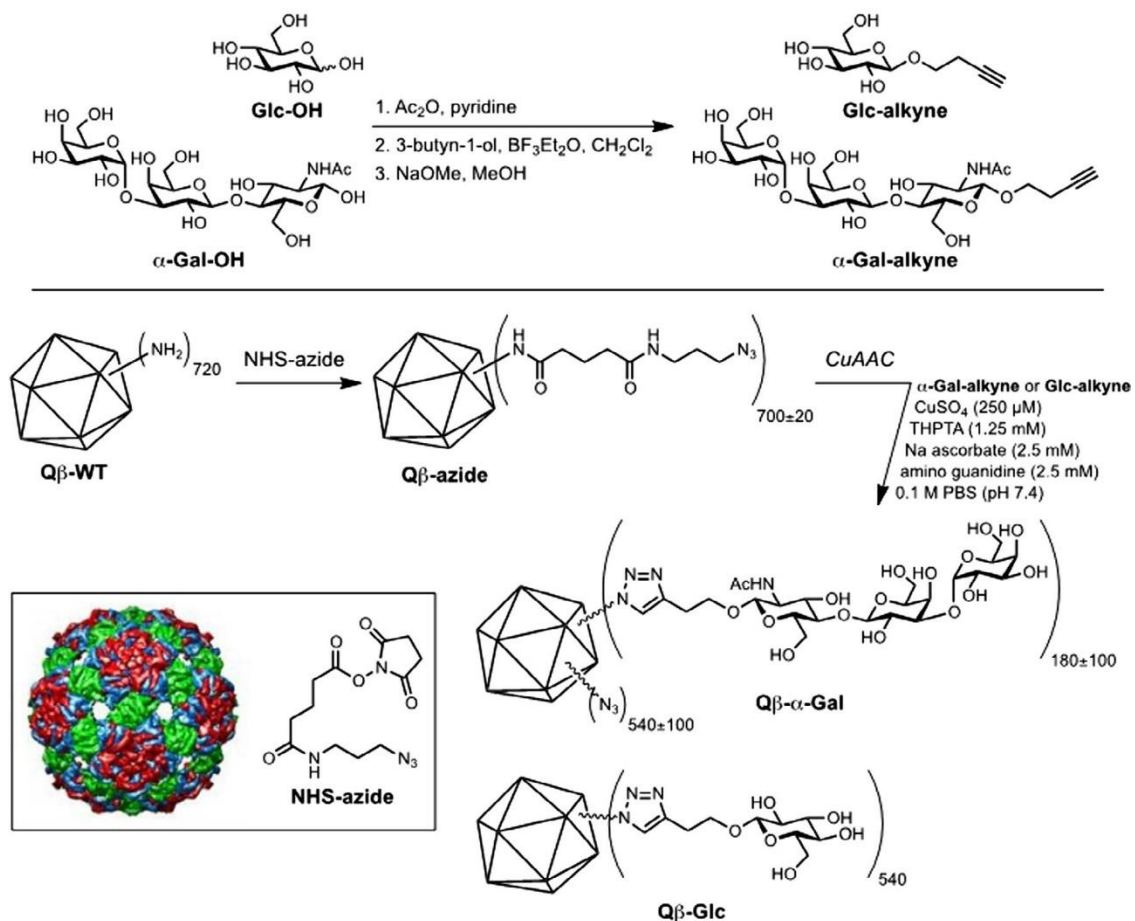


Figura 6: Preparação da nanopartículas de α -Gal e de Q β -Glicose acopladas ao VLP: As partículas foram convertidas em seus derivados de alquino e foram ligadas ao bacteriófago por um procedimento de dois passos em que a proteína foi acilada primeiro em um éster N-hidroxissuccinimida terminal azida (NHS-azide) e, em seguida, dirigida por cicloadição azida-alcino, catalisada por cobre (Strable e Finn, 2009).

Com o objetivo de avaliar primeiramente a produção de anticorpos anti- α -Gal nos camundongos *Knockout* para α -1,3 galactosiltransferase (α GalTKO), um grupo de animais (n=13) α GalTKO recebeu duas doses de 10 μ g de α -Gal ligado ao bacteriófago Q β -VLP, denominado de Q β - α Gal, em 200 μ L de PBS estéril, e outro grupo recebeu Q β -Glc, que foi usada como partícula controle. O mesmo ensaio foi realizado em grupos α GalT-WT.

A figura 7 mostra o protocolo de imunizações realizado. As doses foram aplicadas na região inferior do peritônio, sendo a 1ª dose aplicada quinze dias antes da infecção, e a 2ª oito dias. Após as imunizações, todos os grupos de animais foram testados para produção de anticorpos anti- α -Gal por ELISA. Com o intuito de avaliar se as imunizações conferiram proteção às infecções por *L. amazonensis* e por *L. infantum*, foram realizadas, também nessa

fase, infecções experimentais em grupos de camundongos α GalT-KO imunizados e não imunizados.

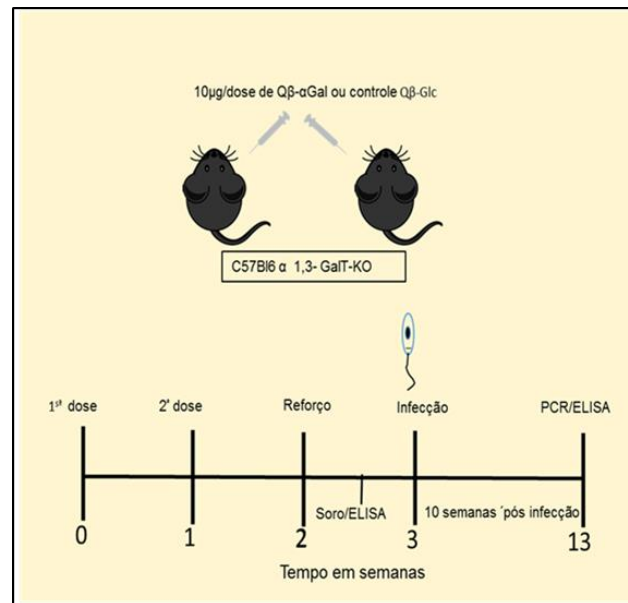


Figura 7: Protocolo de vacinação nos camundongos α GalT-KO: Os camundongos foram imunizados com 3 doses de 10 μ g Q β - α Gal. Uma semana após a última imunização foi realizado ELISA anti- α -Gal e todos os grupos foram infectados com 10^7 de promastigotas de *L. infantum* (por via intraperitoneal) e *L. amazonensis* (por via subcutânea). Após 10 semanas de infecção foram coletados fígado e baço para quantificar a carga parasitária por qPCR. Três ou mais experimentos independentes foram realizados em grupos contendo 3 a 7 camundongos.

A composição dos grupos experimentais de camundongos α GalT- KO imunizados está representada na tabela 3.

Tabela 3: Composição dos grupos experimentais de camundongos C57BL/6 α GalT-KO Imunizados e α GalT-KO Não imunizados.

GRUPO (n = 3-5)	VIA (volume inoculado)	INÓCULO (10⁷ promastigota)
KO Imunizados	IP/ 200 μ L	<i>L. infantum</i>
KO Imunizados	SC/ 10 μ L	<i>L. amazonensis</i>
KO Imunizados	IP/SC	Solução salina
KO Não imunizados	IP/ 200 μ L	<i>L. infantum</i>
KO Não imunizados	SC/ 10 μ L	<i>L. amazonensis</i>
KO Não imunizados	IP/SC	PBS 1 X

5.3.2. Avaliação da produção de anticorpos anti α -Gal, e avaliação da carga parasitária nos grupos experimentais da fase 3.

As avaliações sorológicas para verificar a produção de anti IgG α -Gal e as avaliações da carga parasitária de *L. amazonensis* e *L. infantum* no baço e no fígado dos grupos experimentais utilizados nessa fase foram realizadas conforme metodologias descritas nos itens 5.2.3.4 e 5.2.3.5 da fase 2 desse trabalho.

5.4. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o *GraphPad Prism 5.0* (Prism Software, Irvine, CA, USA). Depois de demonstrada a normalidade dos dados usando o teste de *Kolmogorov-Smirnoff*, foi realizada análise de variância (ANOVA one-way) seguida de pós-testes de Bonferroni para determinar as diferenças específicas entre os grupos.

6. RESULTADOS

Apresentação dos resultados

Os dados obtidos nesse trabalho serão apresentados na mesma sequência das metodologias descritas. Serão apresentados na **Fase 1** o conjunto de dados gerados referentes à identificação do epítipo α -Gal nas espécies de *Leishmania amazonensis* e *L. infantum*. A presença do epítipo α -Gal foi avaliada inicialmente nas formas promastigotas e, em seguida, nos lisados totais desses parasitos, utilizando-se de diferentes técnicas.

Na **Fase 2** serão apresentados os resultados obtidos das avaliações das infecções experimentais realizadas em grupos de camundongos *knockout* (KO) e selvagens (WT) para a α -galactosiltransferase por *L. amazonensis* e *L. infantum*, nas quais foram feitas avaliações da produção de anticorpos anti- α -Gal pelos animais infectados, e também avaliação da carga parasitária no baço e no fígado dos animais infectados.

Por último, devido a avaliação da carga parasitária obtidas nos grupos de animais *knockout* (KO) para a α -galactosiltransferase, esse projeto se propôs a avaliar a possível proteção conferida pela imunização com Q β - α -Gal aos animais experimentais. Esses resultados serão apresentados na **Fase 3**.

6.1. RESULTADOS OBTIDOS NA FASE 1

6.1.1. Identificação do epítipo α -Gal nas formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*.

6.1.1.1. Análise da presença do epítipo α -Gal por microscopia

Foi utilizada lectina MOA-FITC para verificar a marcação do terminal do epítipo α -Gal em formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Observa-se que em *L. amazonensis* ocorre maior fluorescência, como indicado pelas setas, podendo indicar localização do epítipo principalmente na membrana do parasito. Em *L. infantum*, a reatividade é menor se comparada com a marcação observada nas formas promastigotas de *L. amazonensis* (Figura 8).

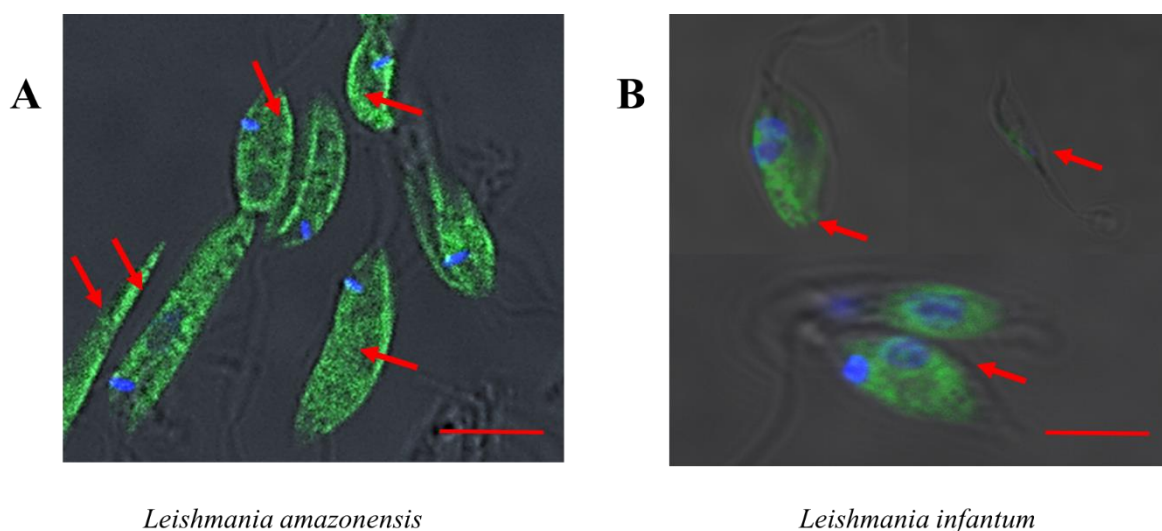


Figura 8: Ensaio de imunofluorescência do epítipo α -Gal nas formas promastigotas de *L. amazonensis* (A) e *L. infantum* (B). Nas figuras estão demonstradas marcação utilizando Marasmus oreades (MOA-FITC), marcação de núcleo e região do cinetoplasto (DAPI). Estão sendo ilustradas fotomicroscopias com aumento de 100x (barra: 5 μ m).

6.1.1.2. Análise da presença do epítipo α -Gal por citometria de fluxo

Na figura 9 estão representados os dados obtidos da marcação com lectina (MOA-FITC), que se liga especificamente ao terminal α -Gal. A análise dos dados obtidos no ensaio de citometria de fluxo mostra que o percentual de células positivas para α -Gal foi maior na população de formas promastigotas de *L. amazonensis* em relação à população de *L. infantum*.

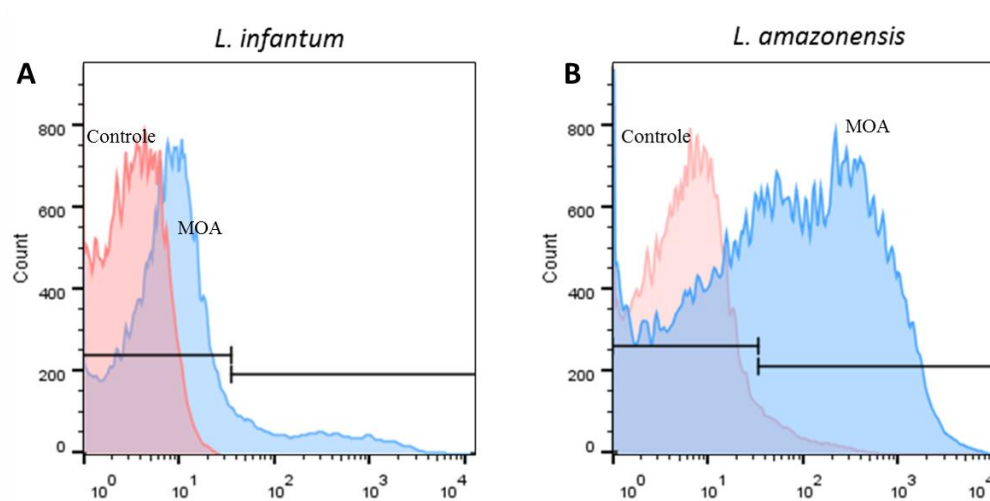


Figura 9: Análise da marcação do α -Gal por citometria de fluxo em *L. amazonensis* (A), e *L. infantum* (B). Na figura estão representados análise comparativa em histograma da intensidade média de fluorescência (IMF) dos parasitos marcados com lectina MOA-FITC. Foi utilizado como controle parasitos não marcados como critério para delimitar a IMF. Os dados foram obtidos no citômetro FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA).

6.1.2. Identificação do epítipo α -Gal nos lisados de *L. amazonensis* e *L. infantum*.

6.1.2.1. Análise da presença do epítipo α -Gal por ELISA, e da especificidade da reação com tratamento com α -Galactosidase.

Os dados obtidos no ELISA utilizando lectina MOA biotilado para reatividade com o epítipo e anti- α -Gal identificaram a presença do epítipo α -Gal nas formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Foi observada alta reatividade com a lectina e com o anticorpo primário anti- α -Gal, sendo mais acentuada nos ensaios com *L. amazonensis* do que com *L. infantum* (Figura 10A). Esses resultados corroboram a marcação por citometria de fluxo e imagens de microscopia. A especificidade da ligação foi verificada com tratamento pela α -galactosidase e mostrou resultados coerentes, indicando a ausência de ligações inespecíficas, como pode ser visto na figura 10B.

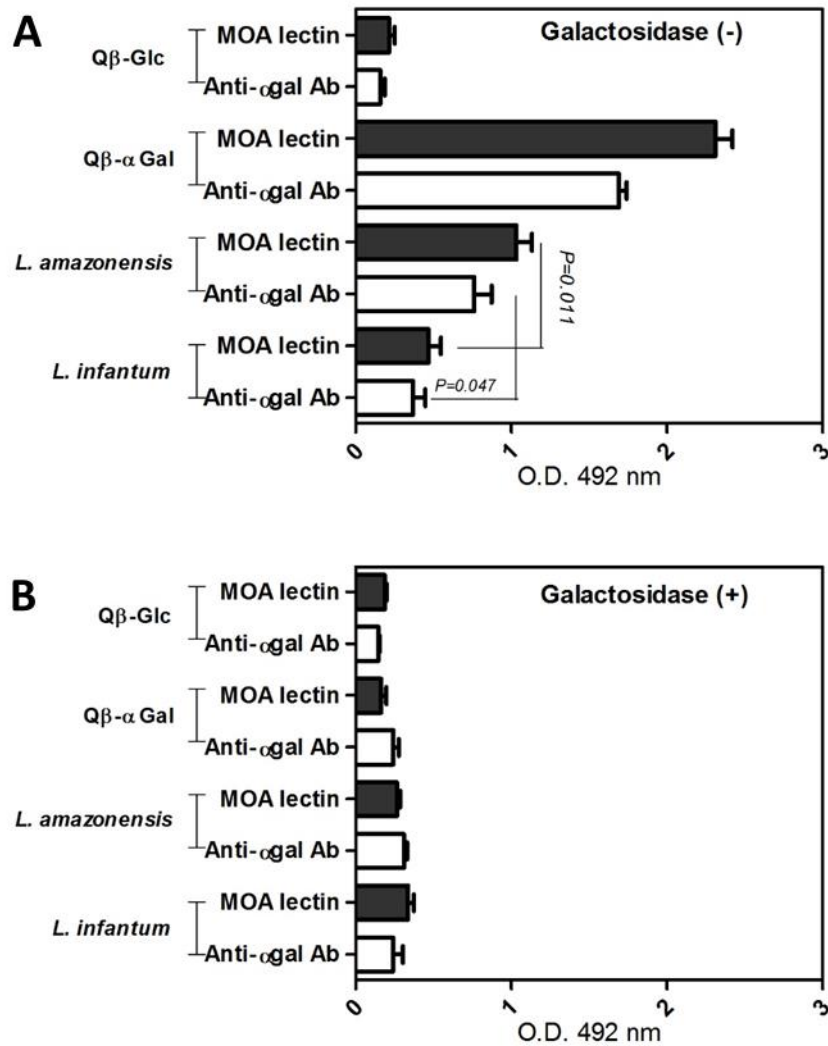


Figura 10: Identificação do epítipo α -Gal por ELISA em formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*. ELISA utilizando extratos proteicos de formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, IgG anti α -Gal, e lectina MOA biotilado como anticorpos primários (A). Foi realizado tratamento over night com α -galactosidase. (B). Foram usados como controles positivo e negativo Q β α -Gal e Q β Glicose, respectivamente, e a leitura foi feita 492nm O.D. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

6.1.2.2. Análise da presença do epítipo α -Gal por *Western Blot*

O ensaio de *Western Blot* utilizando anti- α -Gal como anticorpo primário mostrou reatividade em bandas de proteínas de peso molecular variando entre 25-116 kDa. O extrato de carne de corpo usado como controle positivo nesse ensaio, também mostra bandas reativas com peso molecular entre 45-116 kDa indicando que podem ser bandas características do epítipo α -Gal. Foi possível observar maior quantidade de bandas reativas nos extratos de *L.*

amazonensis em relação ao extrato de *L. infantum*, corroborando os resultados obtidos nos ensaios anteriores (Figura 11).

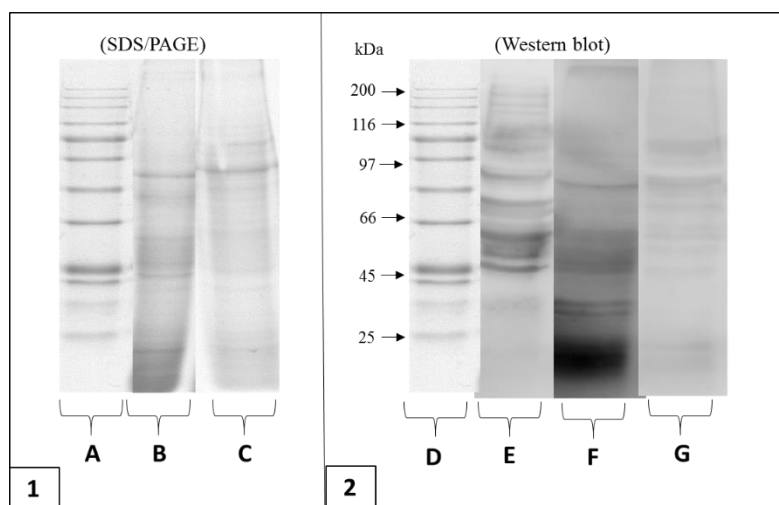


Figura 11: Análise da presença do epítipo α -Gal por Western Blot em extratos proteicos de formas promastigotas: 1) Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5%: (A) Padrão de peso molecular, (B) *L. amazonensis*, e (C) *L. infantum*. 2) Membrana de Western Blot: (D) Padrão de peso molecular (E) Controle positivo (extrato de carne de porco) (F) *L. amazonensis* (G) *L. infantum*.

6.1.2.3. Análise do extrato de *L. amazonensis* e *L. infantum* após purificação em coluna de lectina

As amostras obtidas no ensaio de extração de proteínas totais das formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* foram purificadas em coluna de lectina (EY Laboratories, UK), em seguida foram analisadas em gel de poliacrilamida, e também foi realizado ELISA para detecção do epítipo α -Gal. Os resultados dessas análises estão apresentados a seguir.

6.1.2.4. Perfil de bandas das proteínas após purificação em coluna de Lectina (MOA)

Observa-se na figura 12 um padrão similar de bandas entre o controle (Q β -VLP vírus contendo 540 moléculas de α -Gal ligadas) e as amostras das frações ligadas a lectina. As frações obtidas de *L. amazonensis* parecem conter bandas mais evidentes, podendo apresentar maior quantidade do epítipo α -Gal do que as frações de *L. infantum*, corroborando com os resultados descritos nos itens anteriores.

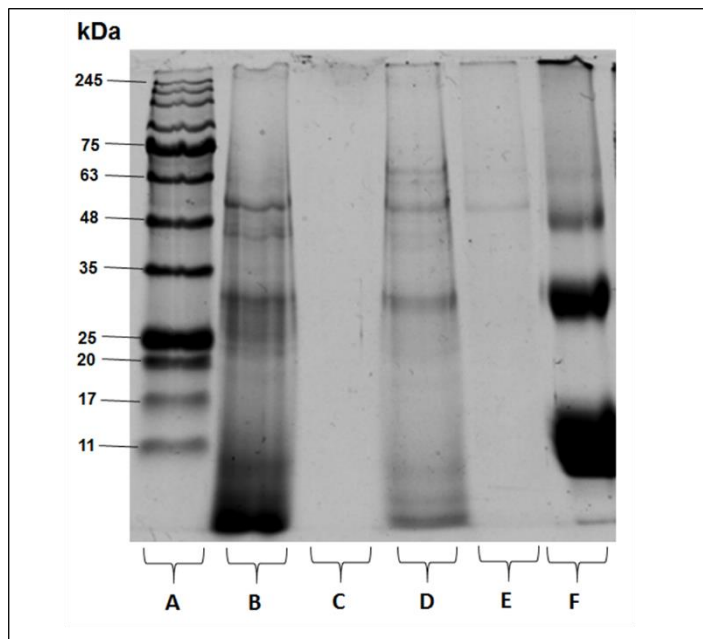


Figura 12: Gel de poliacrilamida a 12 %, corado por Coomassie, das frações obtidas após purificação em coluna Lectina (MOA). (A) Padrão de peso molecular, (B, C) Eluído e eluente de *L. amazonensis* (D, E) Eluído e eluente de *L. infantum*. (F) Q β -VLP vírus contendo 540 moléculas do epítipo α -Gal ligadas (controle positivo).

6.1.2.5. Análise da presença de α -Gal nos extratos purificados em coluna de Lectina (MOA) por ELISA

Os resultados obtidos no ELISA usando lectina MOA biotinizada que se liga especificamente ao epítipo α -Gal estão representados nos gráficos da figura 13. Pode ser observado no gráfico A maior reatividade nos ensaios realizados com os extratos de *L. amazonensis* do que com *L. infantum*. Foi possível confirmar a especificidade da reação com tratamento com α -galactosidase, como pode ser visto no gráfico B.

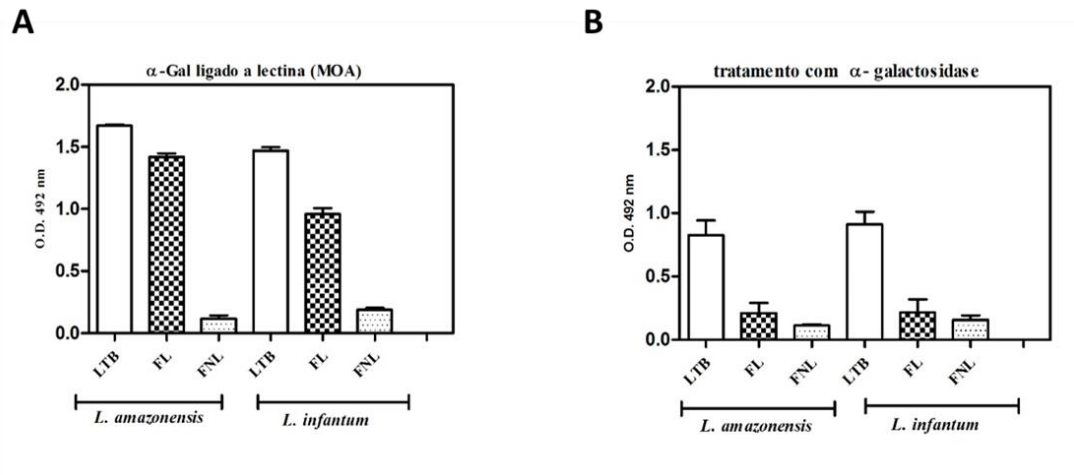


Figura 13: Identificação do epítipo α -Gal em frações purificadas de *L. amazonensis* e *L. infantum* por ELISA: Foram analisados os extratos proteicos de *L. amazonensis* e de *L. infantum* (LTB), as frações ligadas a lectina (FL), e as frações não ligadas (FNL). O gráfico **A** mostra os resultados do ELISA com Lectina MOA e o gráfico **B** os resultados após tratamento com α -galactosidase, e a leitura foi feita a 492nm O.D. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas.

6.2. RESULTADOS OBTIDOS NA FASE 2

6.2.1. Avaliação da produção de anti- α -Gal nos grupos experimentais de camundongos C57BL/6 *Knockout* (α GalT-KO) e *wild type* (α GalT-WT) para α -galactosiltransferase, infectados por *L. amazonensis* e por *L. infantum*.

Na fase 1 deste trabalho foi identificada a presença do epítopo α -Gal nas espécies de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Para avaliar a produção de anticorpos contra esse epítopo, inicialmente foram realizadas infecções experimentais por essas espécies em grupos de camundongos *knockout* para a enzima α -galactosiltransferase (α GalT-KO). Esses camundongos, por não expressarem o epítopo α -Gal em suas células, são capazes de produzirem anticorpos IgG anti- α -Gal. Mesmo procedimento foi realizado em grupos de camundongos *wild type* (α GalT-WT).

A figura 14 apresenta, em formato de gráficos de barras com desvio padrão, os resultados dos ensaios realizados, para avaliar a produção de anticorpos IgG anti- α -Gal, pelos animais dos grupos experimentais em diferentes tempos. Foram utilizados como grupos controle animais não infectados.

Nos grupos de camundongos α GalT-KO infectados com *L. amazonensis* e *L. infantum* pode ser verificado um aumento significativo de IgG anti- α -Gal em relação ao grupo não infectado, não havendo diferença entre os tempos analisados. Verifica-se também maior reatividade nos grupos infectados com *L. amazonensis*, corroborando os dados obtidos na fase 1 desse trabalho, que indica presença mais acentuada do epítopo α -Gal em *L. amazonensis* (Figura 14A).

Os grupos de camundongos α GalT-WT infectados por *L. amazonensis* e por *L. infantum* não apresentaram títulos de IgG anti- α -Gal significativos em relação ao grupo de animais não infectados, confirmando que, por expressarem o epítopo α -Gal em suas células, esses animais não produzem anticorpos anti α -Gal. (Figura 14B)

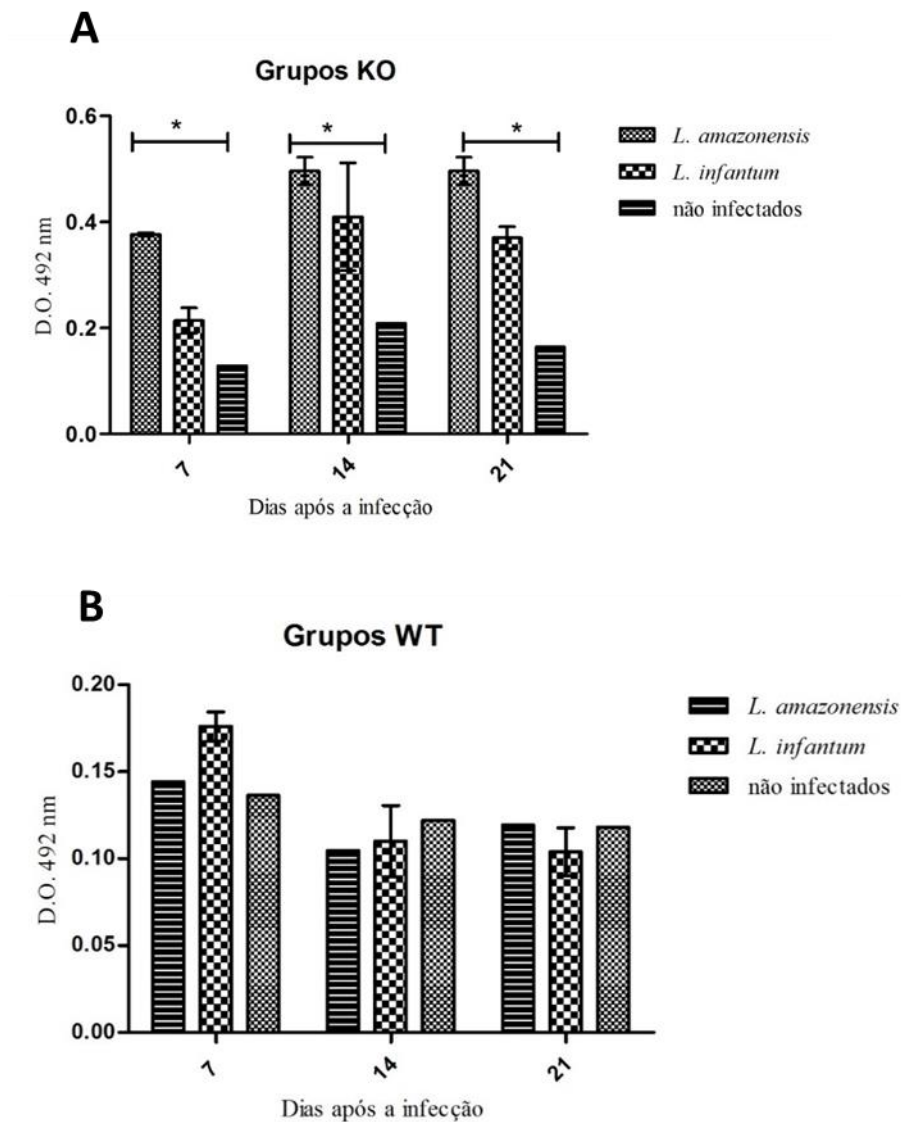


Figura 14: Detecção de IgG anti α -Gal nos soros dos camundongos dos grupos *Knockout* para α -galactosiltransferase (α GalT-KO) (A) e grupos *wild type* (α GalT-WT) (B): ELISA realizado com pool de soros dos grupos infectados com *L. amazonensis*, com *L. infantum*, e o do grupo não infectado. Os soros foram coletados 7, 14 e 21 dias após a infecção. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por *($P < 0.001$).

6.2.2. Avaliação da carga parasitária no baço e no fígado dos animais dos grupos experimentais de camundongos C57BL/6 *Knockout* (α GalT-KO) e *wild type* (α GalT-WT) para α -galactosiltransferase, infectados por *L. amazonensis* e *L. infantum*.

A carga parasitária no baço e no fígado dos camundongos dos grupos experimentais α GalT-KO e α GalT-WT foi determinada pela técnica de PCR quantitativa (qPCR). Os resultados obtidos mostraram diferença entre os grupos (Figura 15). Podemos observar que nos animais pertencentes ao grupo α GalT-KO, quando foi encontrado o DNA do parasito, a carga parasitária foi menor do que nos animais do grupo α GalT-WT. Vale ressaltar, também, a

presença de *L. amazonensis* no fígado e no baço dos animais infectados, indicando visceralização da espécie, o que normalmente está associado à forma tegumentar da leishmaniose.

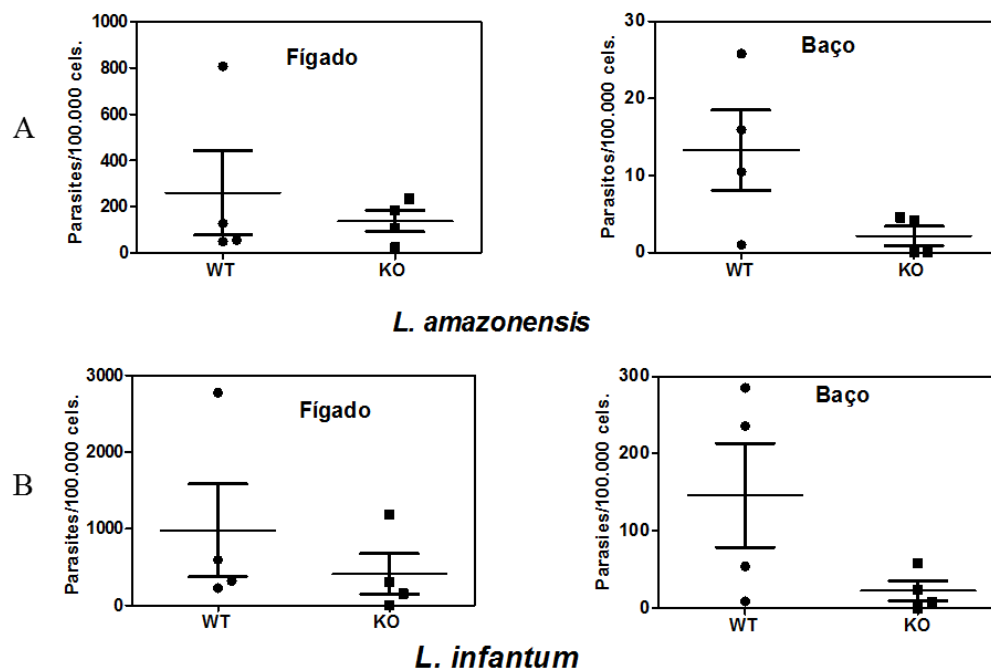


Figura 15: Avaliação da carga parasitária no fígado e no baço dos animais dos grupos experimentais de camundongos C57BL/6 *Knockout* (α GalT-KO) e *wild type* (α GalT-WT) para α -galactosiltransferase, infectados por *L. amazonensis* (A) e por *L. infantum* (B): a carga parasitária foi determinada pela técnica de PCR quantitativa.

6.3. RESULTADOS OBTIDOS NA FASE 3

Os resultados obtidos na fase 2 desse trabalho nos mostrou que nos grupos α GalT-KO ocorreu uma pequena proteção à infecção pelas espécies de *Leishmania* estudadas, quando comparados com os grupos α GalT-WT. Essa observação nos encorajou a avaliar se os animais, quando estimulados com o epítipo α -Gal, produziram maior quantidade de anticorpo IgG anti- Gal, e se ocorreria proteção desses animais frente a infecções por *L. amazonensis* e *L. infantum*. Os resultados obtidos nessa fase estão apresentados a seguir.

6.3.1. Avaliação da produção de IgG anti- α -Gal por camundongos imunizados com partículas de Q β - α -Gal

Com objetivo de avaliar a competência dos camundongos α GalT-KO em produzirem anticorpos IgG contra o epítipo α -Gal, foram realizadas imunizações com α -Gal ligado ao bacteriófago Q β -VLP, e o grupo controle foi imunizado com o Q β -glucose. As mesmas imunizações foram realizadas também com grupos α GalT-WT. Após as imunizações, foram realizados ELISA para análise da produção de anti α -Gal e os resultados obtidos estão representados na figura 16. Os títulos de anticorpos foram muito mais elevados no grupo α GalT-KO imunizado do que no grupo α GalT-WT imunizado, e também maior do que o grupo usado como controle negativo (Figura 16).

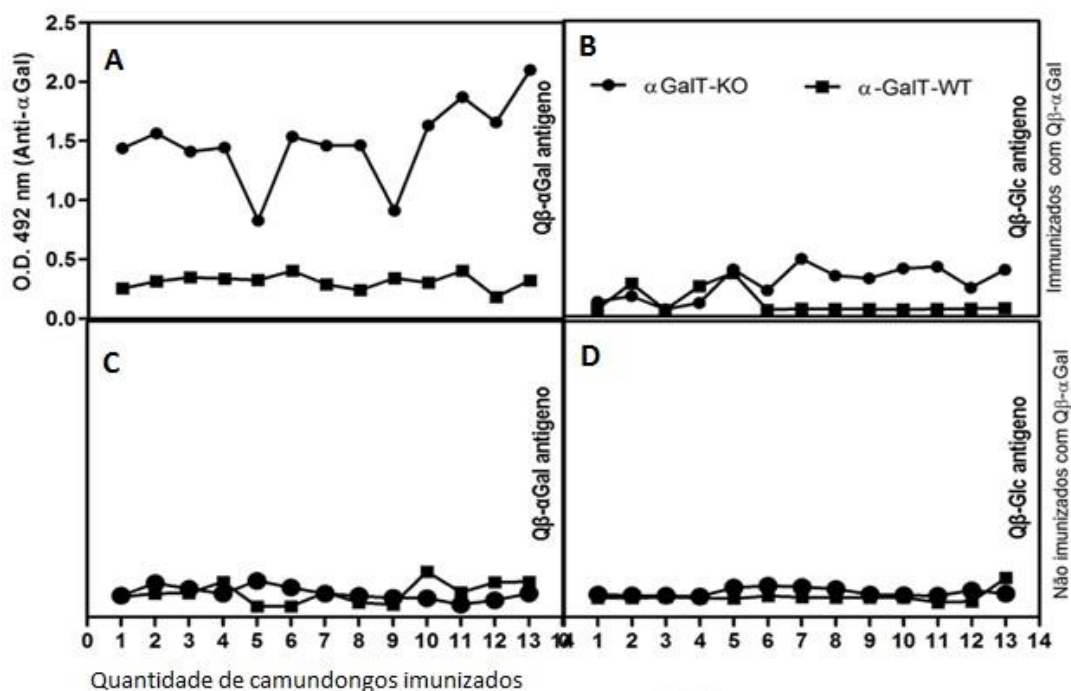


Figura 16: Detecção de IgG anti α -Gal por ELISA nos soros dos camundongos imunizados: produção de anticorpos anti α -Gal pelos grupos imunizados α GalT-KO e α GalT-WT ao antígeno Q β - α Gal (A); ao antígeno Q β - α Glicose (B); produção de anticorpos anti α -Gal pelos grupos não imunizados α GalT-KO e α GalT-WT antígeno Q β - α Gal (C); ao antígeno Q β - glicose (D).

6.3.2. Avaliação da carga parasitária no baço e fígado dos grupos de camundongos C57BL/6 *Knockout* para α -galactosiltransferase imunizados (α GalT-KOI) e não imunizados com α -Gal (α GalT-KO), infectados por *L. amazonensis* e *L. infantum*.

Com o objetivo de avaliar se as imunizações conferiram proteção às infecções por *L. amazonensis* e por *L. infantum*, a carga parasitária foi avaliada nos grupos imunizados e não imunizados. A figura 17 mostra que houve maior proteção nos grupos imunizados. Observou-se, em relação à infecção por *L. amazonensis*, que não foi encontrado parasitismo no fígado e nem no baço dos animais imunizados, indicando que não ocorreu visceralização das espécies, como nos grupos KO não imunizados. Em relação à infecção por *L. infantum*, apenas um animal imunizado apresentou parasitismo no fígado, numa carga inferior em relação aos animais não imunizados, e nenhum animal imunizado apresentou parasitismo no baço.

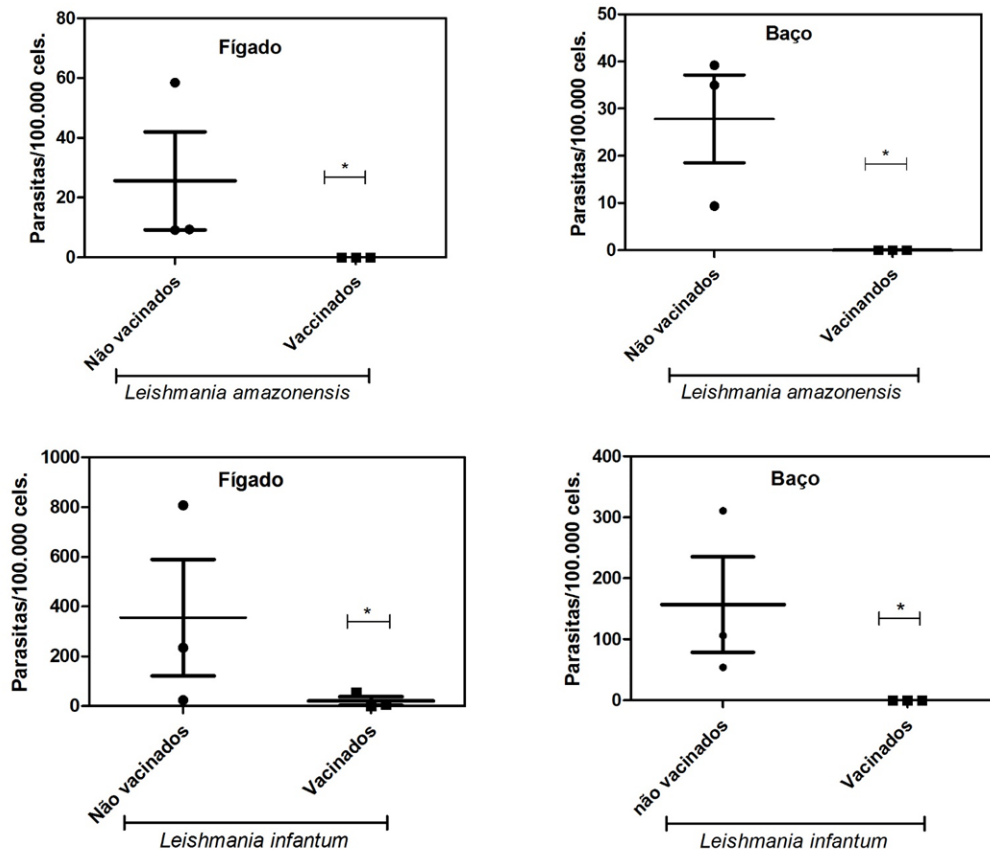


Figura 17: Avaliação da carga parasitária no fígado e baço dos animais dos grupos α GalT-KO imunizados com α -Gal e não imunizados, infectados por *L. amazonensis* (A), e por *L. infantum* (B): a carga parasitária foi determinada pela técnica de PCR quantitativa. (* p < 0,05). Três ou mais experimentos independentes foram realizados nos grupos contendo 3 a 7 camundongos.

7. DISCUSSÃO

As leishmanioses ainda representam um grave problema de saúde pública, sendo consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das principais doenças parasitárias, afetando cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo. Cerca de 350 milhões de pessoas têm risco de desenvolver uma das muitas formas da doença (WHO 2016). No Brasil, a forma visceral é causada por *Leishmania infantum* e grande parte do número de casos das formas tegumentares está associada à *L. amazonensis* (Ministério da Saúde 2016).

O tratamento é baseado em quimioterapia, que utiliza drogas com limitações graves, como alto custo, toxicidade, e falta de eficácia em áreas endêmicas. A produção de uma vacina segura, eficaz e acessível à população continua sendo a principal esperança para o controle de todas as formas da doença (Lukasz 2010).

Sabe-se que a interação parasito/hospedeiro é bastante complexa e que a superfície do parasito desempenha um papel importante, pois está exposta a diferentes ambientes nos hospedeiros invertebrado e vertebrado. Nesse contexto, muitos estudos têm focado na caracterização de moléculas do parasito que fazem parte dessa interface parasito/hospedeiro (Descoteaux & Turco 1999; Ilgoutz & McConville 2001).

Dentre as moléculas de superfície descritas em *Leishmania spp*, os glicoconjugados assumem papel de destaque, sendo considerados como principais: lipofosfoglicano (LPG), proteínas ancoradas em glicosilfosfatidinositol (GPI), glicoinositolfosfolípídeos (GIPLs) e proteofosfoglicanos (PPG). Esses glicoconjugados são parte do glicocálice da forma promastigota e são considerados como importantes fatores de virulência, contribuindo para uma infecção bem-sucedida (Descoteaux & Turco 1999). Após a picada do flebotomíneo, as formas promastigotas de *Leishmania spp* interagem principalmente com células fagocíticas, e essa interação é um passo importante para a fixação e a invasão das células hospedeiras. Os glicoconjugados presentes na superfície do parasito podem contribuir para a virulência de espécies de *Leishmania*, mediando a adesão à célula hospedeira (Desjardins & Descoteaux 1997). Nos últimos anos, grandes avanços foram alcançados na compreensão da biologia das espécies do gênero *Leishmania*, entretanto muitas perguntas sobre o mecanismo molecular de virulência continuam sem resposta.

O carboidrato com estrutura Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAcR, denominado α -Gal, está presente em glicoconjugados de mamíferos não primatas, prosímios e macacos do Velho Mundo. Esse epítipo estimula a produção de anticorpo anti α -Gal em humanos, que são considerados tolerantes (Galili et al. 1987a; 1988 e 2013; Macher & Galili 2008). Recentemente, níveis elevados desses anticorpos foram detectados em pacientes curados com

leishmaniose cutânea causada por *L. major* e *L. tropica* (Al-Salem 2014). Esses achados nos instigaram a levantar a hipótese de que esse epítipo estaria presente na superfície de *Leishmania spp.* e que os anticorpos anti α -Gal poderiam, de certa forma, participar do desenvolvimento da doença.

Nessa perspectiva, nesse trabalho, nós identificamos a presença do epítipo α -Gal em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. infantum*. Nós identificamos primeiramente o epítipo nas células, por meio da ligação da lectina MOA (*Marasmius oreades*) FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*), por citometria de fluxo e imunofluorescência. Em seguida, identificamos também nos lisados totais de proteínas, utilizando as técnicas de *Western Blot* e ELISA com anticorpo primário anti- α -Gal. Utilizando diferentes técnicas nós conseguimos verificar que, em *L. amazonensis*, o epítipo é expresso de forma mais significativa do que em *L. infantum*.

A localização do epítipo α -Gal em alguns parasitos tem sido estudada. Em *Trypanosoma cruzi*, o epítipo é expresso principalmente em moléculas de superfície do tipo mucina (Almeida et al. 1994). Estudando a Malária, os autores identificaram o epítipo na superfície do *Plasmodium spp.*, e sugeriram que o α -Gal está em proteínas de superfície ancoradas por GPI (Yilmaz et al. 2014). Em relação às espécies de *Leishmania*, estudando a resposta humoral em pacientes infectados com *L. major*, os autores associaram a produção de anticorpos anti α -Gal aos terminais de α -Gal presentes em glicoinositolfosfolipídeos (GILPs) (Avila et al. 1991). Por exemplo, já foi descrito que a espécie *L. major* apresenta os GILPs do tipo 2 e 3, que contêm resíduos de Gal α 1-3Gal β - e Gal α 1-6Gal α 1-3Gal β , respectivamente (McConville et al. 1990). No entanto, é intrigante que, embora tenha sido relatado altos níveis de anticorpos anti α -Gal em pacientes com *L. tropica*, essa espécie expressa apenas GILPs do tipo 1, que não contém resíduos de α -Gal (McConville et al. 1995). Estudando a estrutura dos GILPs em *L. braziliensis* e *L. infantum*, os autores sugeriram que essas espécies apresentam os GILPs do tipo 2 e 1, respectivamente (Assis et al. 2012). Dessa forma, considerando o polimorfismo estrutural interespecífico apresentado pelos GILPs de *Leishmania*, outros estudos são necessários para identificar a localização do epítipo α -Gal nas espécies *L. amazonensis* e *L. infantum*.

Já é bem estabelecido que na leishmaniose visceral, causada por *L. infantum*, os parasitos são capazes de escapar ao sistema imune do hospedeiro e atingir órgãos internos como fígado e baço. Por outro lado, na leishmaniose cutânea ou mucocutânea causada por *L. amazonensis*, os parasitos causam lesões e se multiplicam intensamente no local da infecção. Assim, é possível especular que, embora numerosos mecanismos estejam relacionados com a

virulência das espécies de *Leishmania*, o epítipo α -Gal pode estar envolvido nesse processo de visceralização da espécie.

Os modelos experimentais usados para o estudo da leishmaniose são mamíferos que, diferentemente dos humanos, expressam o epítipo α -Gal em seus tecidos, sendo, portanto, tolerantes à produção de anticorpos α -Gal. Foram relatados casos de visceralização de espécies associadas à forma tegumentar, como *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. tropica* e *L. major* em animais experimentais, tais como camundongos e hamsters, que não mimetizam a condição humana na produção de anticorpos anti α -Gal (Almeida et al. 1996; Abreu-Silva et al. 2004; Soliman 2006; Mahmoudzadeh-Niknam et al. 2007; Kobets et al. 2012; Gomes-Silva et al. 2013; Ribeiro-Romão et al. 2014). Um único estudo relatou a visceralização de *L. amazonensis* em humanos (Barral et al. 1991), e esse resultado pode ser atribuído a uma possível variação genética do parasito e também a outros fatores, tais como a resposta imune e características do indivíduo (Soliman 2006). Assim, verificamos que os resultados obtidos em animais experimentais rotineiramente utilizados para o estudo da leishmaniose não são consistentes, o que pode ser atribuído ao fato desses animais não se assemelharem aos humanos no contexto da produção de anticorpos anti α -Gal.

De fato, nossos resultados referentes à infecção experimental utilizando modelos de camundongos C57BL/6 selvagens para o gene que codifica a enzima α -Galactosiltransferase (α -GalT- WT) apresentaram diferenças na progressão da doença em relação aos animais *knockout* (α -GalT-KO). Nós observamos que os animais α -GalT-KO, além de produzirem níveis mais elevados de anticorpos anti α -Gal, também apresentaram carga parasitária reduzida no baço e no fígado em relação aos animais α -GalT-WT. Nossa hipótese é que o aumento dos níveis de anticorpos anti α -Gal confere certa proteção à infecção.

Com o intuito de explorar melhor a participação dos anticorpos anti α -Gal na proteção das formas clínicas de leishmaniose causadas por *L. amazonensis* e *L. infantum*, na terceira etapa desse trabalho, nós realizamos imunizações com o epítipo α -Gal acoplado ao Q β “*Virus Like Particle*” (Q β - α -Gal) para verificar se os níveis de anticorpos anti- α -Gal mais elevados poderiam proteger esses camundongos da infecção por *Leishmania*.

Diferentes protocolos de imunização já foram utilizados em outros estudos para estimular a produção de anticorpos anti- α -Gal em animais α -GalT-KO (Wigglesworth et al. 2011; Galili 2011; Araujo et al. 2016). No protocolo utilizado nesse trabalho, nós imunizamos camundongos α -GalT-KO e também α -GalT-WT e, após verificarmos o aumento dos níveis de anticorpos anti- α -Gal apenas nos animais α -GalT-KO, nós infectamos esse grupo imunizado. Nossos resultados demonstraram proteção contra a infecção por *L. amazonensis* e por *L. infantum*. Ao avaliarmos a carga parasitária no fígado e baço dos animais imunizados e

infectados, nós verificamos diferenças significativas quando comparamos com os grupos de animais não vacinados.

Estudos recentes demonstraram que anticorpos anti- α -Gal podem proteger contra a infecção experimental da Malária (Yilmaz et al. 2014) e tratamento de queimaduras (Galili et al. 2010b). Também foi observada melhoria na imunogenicidade para vacinas de HIV (Abdel-Motal et al. 2010), ação lítica em *Trypanosoma cruzi* (Towbin H et al. 1987; Gazzinelli et al. 1991), e até mesmo utilização em tratamento de câncer (LaTemple et al. 1999).

Várias funções já foram associadas aos glicoconjugados presentes na superfície de *Leishmania spp.*, principalmente funções relacionadas à evasão do parasito do sistema imune. Neste trabalho encontramos evidências suficientes para levantar a hipótese de que o epítopo α -Gal, identificado na superfície das espécies de *L. amazonensis* e *L. infantum*, que podem causar a leishmaniose cutânea e visceral, pode contribuir para uma infecção bem-sucedida nos hospedeiros. O mecanismo de ação do epítopo α -Gal, assim como a participação de anticorpos α -Gal nas infecções causadas por essas espécies de *Leishmania*, precisa de ser explorado, podendo ser alvo para o desenvolvimento de uma nova vacina contra *L. amazonensis* e *L. infantum*.

8. CONCLUSÕES

- O epítipo α -Gal está presente nas formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, mostrando maior reatividade em *L. amazonensis*.
- A produção de anticorpos IgG anti- α -Gal é mais acentuada em camundongos C57BL/6 *Knockout* para α -galactosiltransferase (α GalT-KO) infectados por *L. amazonensis*, e *L. infantum* em diferentes tempos de infecção, em relação aos camundongos C57BL/6 selvagens (α GalT-WT).
- Os camundongos α GalT-KO imunizados com epítipo α -Gal acoplado ao “*Virus Like Particle*” Q β (Q β - α -Gal) apresentam aumento significativo na produção de anticorpos em relação aos camundongos não imunizados.
- Ocorre proteção contra as infecções por *L. amazonensis* e *L. infantum* nos camundongos α GalT-KO imunizados com Q β - α -Gal.

9. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

9.1. Manuscrito em preparação

- Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados no artigo a seguir.

α -Gal carbohydrate coupled to VLP nanoparticles as vaccine in *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* infection

Ana P. Venuto Moura^{a,b}, Luiza C. B. Santos^a, Carlos R. Nascimento^a, Edward Valencia^a, Adalberto A. P. Filho^a, Luiza A. de Figueiredo, Rayane C. S. Lucas, Caroline Junqueira^d, Ricardo T. Gazzinelli^{a,d}, Mauricio R. V. Sant'Anna^a, Nelder F. Gontijo^a, Daniella C. Bartholomeu^a, Ricardo T. Fujiwara^a, Craig S. McKay^b, Carlos A. Sanhueza^b, M.G. Finn^b, Alexandre Ferreira Marques^{a*}.

^aUniversidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^bGeorgia Institute of Technology, School of Chemistry and Biochemistry, Atlanta, GA, 30332, USA.

^cUniversidade Estadual de Montes Claros-MG

^dCentro de Pesquisas René Rachou

KEYWORDS: *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonensis*, α -Gal, vaccine, carbohydrates.

Supporting Information

Abstract

Carbohydrates have been pointed as essential for virulence and viability for *Leishmania* parasites. Secreted or on the parasite surface, Glycoconjugates may contribute for *Leishmania* survival and efficiently proliferate after immune system evasion. Here in this work we identified the carbohydrate epitope α -Gal on surface of the protozoa parasites *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis*, responsible to cause visceral and cutaneous leishmaniasis respectively. We explored the epitope α -Gal coupled to nanoparticles virus like particles bacteriophage Q β , named Q β - α -Gal as vaccine in experimental leishmaniasis employing C57/BL6 α -Galactosyltransferase knockout mouse model, that is similar to human in producing anti- α -Gal antibody. The α -gal epitope was identified in higher proportion on surface of *L. amazonensis* if compared with *L. infantum*. Infected C57/BL6 α -Galactosyltransferase mice with 10^7 *Leishmania* parasites of both species, decreased significantly the load parasites in the liver, and slightly in the spleen, compared with infection in Wild type mice. Also, we vaccinated these mice with Q β - α -Gal nanoparticles, and vaccinated mice group efficiently controlled the infection and proliferation of *Leishmania parasites* in the liver and spleen, where no parasites were detected by qPCR.

Leishmaniasis, considered endemic in more than 88 countries and a major health problem to humans, is a vector-borne disease diffused by sand flies, which inoculate the parasite into the skin of the host. After escape from immune system, *Leishmania* species may appear as many clinical manifestations^{1,2}. Leishmaniasis conditions depend on aspects that may drive to varied of lesions, alike the species originating the infection, the crossing point between parasites and the mammalian host, host genetics and the immune system integrity³. In the Mediterranean and South American countries, *Leishmania amazonensis* that belongs to *Leishmania Mexicana* complex is the etiological agent of the cutaneous leishmaniasis (CL). The symptoms of the disease remain localized to the skin or mucosal surfaces. And, *Leishmania infantum* is the causative agent of visceral leishmaniasis⁴. In this case, parasites spread to internal organs for instance liver, spleen and bone marrow, having high mortality when not treated^{5,6}.

The mainly glycoconjugates described on *Leishmania* parasites so far comprise of lipophosphoglycan (LPG), glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins (GPI), glycosylphosphatidylinositol lipids (GIPLs) and proteophosphoglycans (PPGs). These glycoproteins on the parasite surface are part of glycocalyx of the promastigotes infective form, playing an important role in the parasite infectivity and sand fly interaction, contributing for the parasite to succeed with the infection^{7,8}. After transmission by blood-sucking sand fly, genus *Lutzomyia* (in the New World), promastigote *Leishmania* parasites interact primarily with phagocytic cells, and this interaction is an important step for attachment and invasion of the host cells. Carbohydrates present on the parasite surface may efficiently contribute for the virulence of *Leishmania* species, mediating the cell host adhesion⁹. Even known the variety of these molecules in *Leishmania*, the molecular mechanism of virulence of this parasitic disease is poorly understood.

Recently, high levels of anti- α -Gal antibodies were detected in cured patients with cutaneous leishmaniasis¹⁰. This found rise the hypothesis about the presence of the α -Gal epitope on the parasite surface. The presence of this epitope on the parasite may stimulate the anti- α -Gal antibody production beyond the anti- α -Gal antibody produced normally by the non-infected patient. In this work we identified the carbohydrate α -Gal on the promastigote form of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania infantum*, species that cause cutaneous and visceral leishmaniasis respectively. Also, we exploited the presence of this α -Gal epitope in *Leishmania* species above and the possible role in this epitope driving the infection and protection in experimental mouse model. For that, we introduce a new mouse model for leishmaniasis, the α -Galactosyltransferase knockout mouse (α GalT-KO)¹¹, which may produce high anti- α -Gal antibodies titers with previous immunization¹². As antigen, we employed the trisaccharide Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R linked to the bacteriophage Q β -VLP (Q β - α -Gal to stimulate α GalT-KO mouse to produce anti- α -Gal antibodies.

For experimental leishmaniasis studies, animal models can be used to evaluate drug candidates, pathology, and immune response post-infection or vaccine protocols. The animal models are highly diverse, but due the presence of anti- α -Gal antibodies in human, that may interfere in the *Leishmania* infection, most of mice models, that are tolerant to anti- α -Gal antibody production, may be missing important information about the host defense related with Th2 immune response and host-parasite interaction. Based on that, in this work we employed, the α Galactosyltransferase Knockout mouse model (α GalT-KO) for experimental leishmaniasis. This mouse model can closer mimics the human immune system for anti- α -Gal antibody production, and this may be a new tool for the future of vaccine studies in *Leishmania* infection.

We investigated the presence of the α -Gal epitope on promastigote forms of *L. infantum* (MCAN/BR/2002/BH401) and *L. amazonensis* species (IFLA/BR/1967/PH8). To perform the experiment we used *Marasmius oryzae* lectin (MOA), which strongly react with carbohydrates Gal α 1,3Gal (but not for the isomeric α 1,2- α 1,4- and α 1,6-disaccharides); Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc; and the type B branched trisaccharide^{13, 14}. Promastigote Cells (10⁸/mL) of *L. infantum* and *L. amazonensis* were labeled with 100-200 mg/mL of *Marasmius oryzae* agglutinin (MOA-FITC). DAPI was used for nucleus staining and cells were taking to fluorescence microscopy¹⁵. Lectin-FITC Labeled and control cells also were quantified in the Flow cytometry for α -Gal epitope identification¹⁶ (more details about the procedures can be found at the supporting information). After incubate the promastigote cells with MOA-FITC and take the samples to the microscopy, we observed stronger reactivity on the cell surface of *L. amazonensis*, **figure 1A** compared with *L. infantum*, **figure 1B**, as pointed by the arrows. To corroborate with this experiment, we labeled promastigote cells using MOA-FITC for flow cytometry fluorescence measurement, performing the refereed protocol¹⁶. In the fluorescence lectin binding profile, we found distinct detected peaks, where *L. amazonensis* in **figure 1C**, clearly denotes higher lectin reactivity, comparing with *L. infantum*, showed in **figure 1D**. Competing sugar, 0.2M of galactose, was added in the control cells, decreasing the reactivity of the lectin, showed in the control peak. In a third experiment, we run an Elisa-Linked Lectin Assay¹⁷, using *L. amazonensis* and *L. infantum* lysates for α -Gal identification. *Leishmania* Lysates were plated and incubated either with MOA-biotinylated and purified anti- α -Gal antibody for α -Gal binding. We observed higher reactivity in the presence of the *L. amazonensis* than *L. infantum* lysates, either using Lectin MOA-Biotin or anti- α -Gal purified antibody, as showed in the **figure 1E**. The binding to the α -Gal specificity was tested by previous incubation with the green coffee beans α Galactosidase enzyme, removing the terminal galactose. After incubation overnight at 26 °C, the reactivity was reduced greater than 90%, showed in the **figure 1F**. These results bring strong evidences that *L. infantum* express lower amount of α -

Gal epitope on its surface, if compared with *L.*

amazonensis

species.

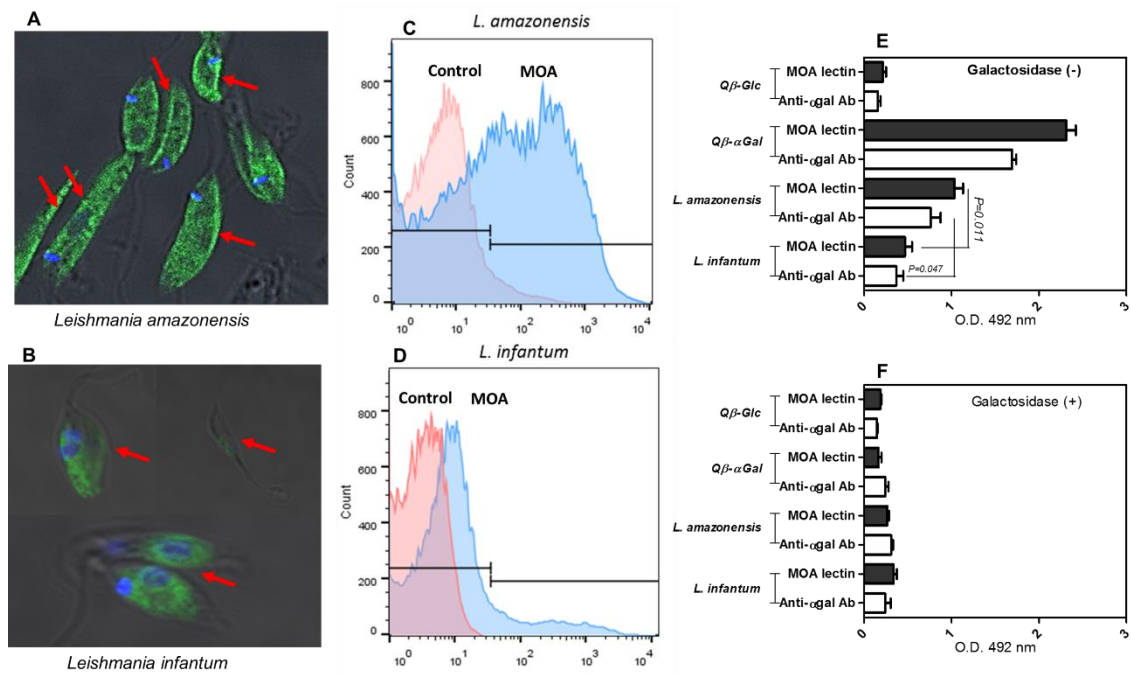


Figure 1. α Gal epitope identification. A,B) *Leishmania amazonensis* and *L. infantum* promastigote cells were treated with 2% of paraformaldehyde after wash, cells were blocked with 5% BSA. Cells were labeled with 3 μ g/mL of Marasmus oreades agglutinin (MOA-FITC). DAPI was used for nucleus staining and cells were taken to fluorescence microscopy. C,D) In this experiment cells were labeled using the protocol above and the fluorescence intensity was measured in the flow cytometry FACSscan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA). E) 2 μ g/mL of biotinylated Marasmus oreades agglutinin (MOA-Biotin) and 3 μ g/mL of anti- α Gal antibody were used to identify the α Gal epitope present in the *Leishmania amazonensis* and *L. infantum* species. ELISA was performed using 10 μ g/mL of leishmania extracts as antigen. For controls, 2 μ mL of α Gal epitope linked to Q β virus like particle (Q β - α -Gal, + control) and 2 μ g/mL glucose linked to the Q β -VLP (Q β -glc,-control) were used; F) For specificity test binding, all antigens were treated overnight with 10U/mL of coffee beans α Galactosidase enzyme. Optical Density (O.D.) of 492 nm. All experiments were performed in triplicate.

It is already known that, in visceral leishmaniasis, caused by *L. infantum*, parasites are able to escape from the host immune system and reach internal organs like liver or spleen, in the other hand, cutaneous or mucocutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*, parasites, most of the time stay at the site of the infection. Although numerous mechanisms are related with leishmania infectivity, glycoproteins on parasite surface are important molecules that are strongly associated with this process, and the α -Gal epitope may be involved in this mechanism. Knowing about the distinct reactivity of lectin in both *Leishmania* species, and the correlation with the presence of α -Gal epitope on the parasite surface, we employed C57/BL6 mouse model that do not express α -Gal epitope on their tissues¹¹ (α -GalT-KO), comparing experimental infection by *L. infantum* and *L. amazonensis* with C57/BL6 wild type mice (α -GalT-WT). Mice models with similarity to the human in experimental leishmaniasis is required for better laboratory results. C57/BL6 mice have been used to study pathogenesis of experimental cutaneous or visceral leishmaniasis, and considering the diversity of *Leishmania* strains, number of parasites used for the infection, the results obtained about clinical manifestations and immune system activation cells are not consistent. In this context, the presence of α -Gal on parasite surface may interfere in the host immune response against the infection. Old world monkeys and Humans, do not have this epitope on their tissues,

but all the other mammals express the α -Gal epitope¹⁸. The α -Gal epitope is highly immunogenic^{19, 20}, and its presence on the parasite surface could generate anti- α -Gal antibodies by the host capable to protect against the infection, as found in others infectious diseases^{19, 20}. However, as the animal models used for experimental leishmaniasis studies are mammals that express α -Gal, they are tolerant for anti- α -Gal antibody production, which may impair the efficiency of the immune response against the parasite. To explore this hypothesis, we used α -GalT-KO mice, that produce antibody against α -Gal epitope, similar to human, and α -GalT-WT mice, which do not produce anti- α -Gal antibody. Groups of animals were infected intraperitoneally with 10⁷ parasites of *L. infantum* and subcutaneously with the same number of *L. amazonensis*. Blood samples for ELISA were collected at the days 7, 14 and 21. Liver and spleen for qPCR procedure were collected 10 weeks post-infection. The levels of antibodies in the serum of infected α -GalT-WT mice, by *L. amazonensis* or *L. infantum* were similar to the control uninfected group, showed in the **figure 2A**. Nonetheless α -GalT-KO infected mice, showed low levels of antibodies against the α -Gal epitope, increasing slightly the reactivity with serum from mice infected with *L. amazonensis*, showed in **figure 2B**. Although the load parasites found by qPCR in the liver was not significant ($P < 0.05$) between α -GalT-KO and α -GalT-WT infected mice by *L. infantum* and *L. amazonensis*,

figures 2C and 2E, in the spleen α -GalT-KO mice both infected groups, the number of parasites

significantly decreased, as showed in the figures 2D and 2F.

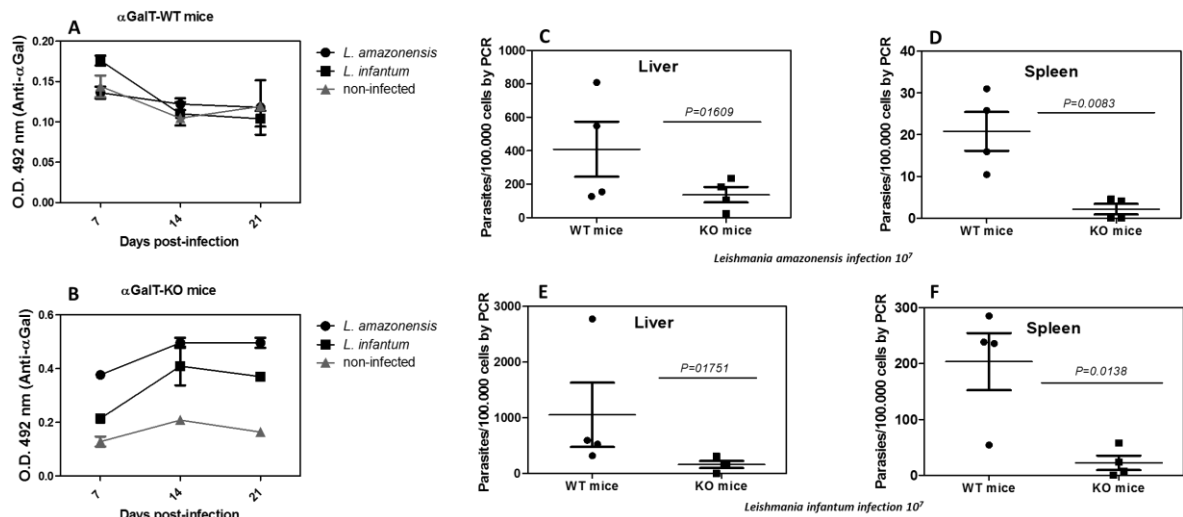


Figure 2. Parasite load levels detected in mice organs. A,B) Parasite load levels in liver and spleen samples of C57/BL6 Wild type (α GalT-WT) and α galactosyltransferase Knock out mice (α GalT-KO) infected with 107 *Leishmania amazonensis*; C,D) Parasite load levels in liver and spleen samples of C57/BL6 Wild type (α GalT-WT) and α galactosyltransferase Knock out mice (α GalT-KO) infected with 107 of *Leishmania infantum*. Three or more independent experiments were performed in group containing 3 to 7 mice.

As the load parasites found in α -GalT-KO infected mice were slightly decreased, compared with α -GalT-WT, we assumed that α -GalT-KO mice demonstrated to be somewhat more resistant than α -GalT-WT infected group. The anti- α -Gal antibodies produced by α -GalT-KO mice could be one possible explanation. To evaluate this hypothesis, we employed the carbohydrate α -Gal coupled to the virus like particle Q β , the Q β - α -Gal particles, to immunize α -GalT-KO mouse model, and observe if higher anti- α -Gal antibody levels could protect these mice from *Leishmania* infection. Different protocol immunization has been used to stimulate α -GalT-KO mice to produce anti- α -Gal antibodies^{12, 21, 22}. Here, we developed an immunization protocol, showed in the figure 3A, to confirm the capacity of these mice to

produce anti- α -Gal antibodies, for this experiment we also included α -GalT-WT group. Groups of 15 mice were immunized 3 times with 10 μ g per dose, one per week, of Q β - α -Gal particles, non-immunized mice were the control. One week later, blood samples were collected and tested for IgG anti- α -Gal antibody production by ELISA, and glucose sugar, Q β -Glc was used as control. Immunized group of α -GalT-KO mice produced higher levels of IgG anti- α -Gal antibodies, in the other hand, α -GalT-WT immunized mice did not produce relevant amount of anti- α -Gal antibodies, showed in figure 3B. The reactivity decreased greater than 97% when the serum was tested against the control particle Q β -Glc, figure 4C. Non-immunized mice showed no levels of IgG antibodies against Q β - α -Gal, figure 3D or Q β -Glc particles, figure 3E.

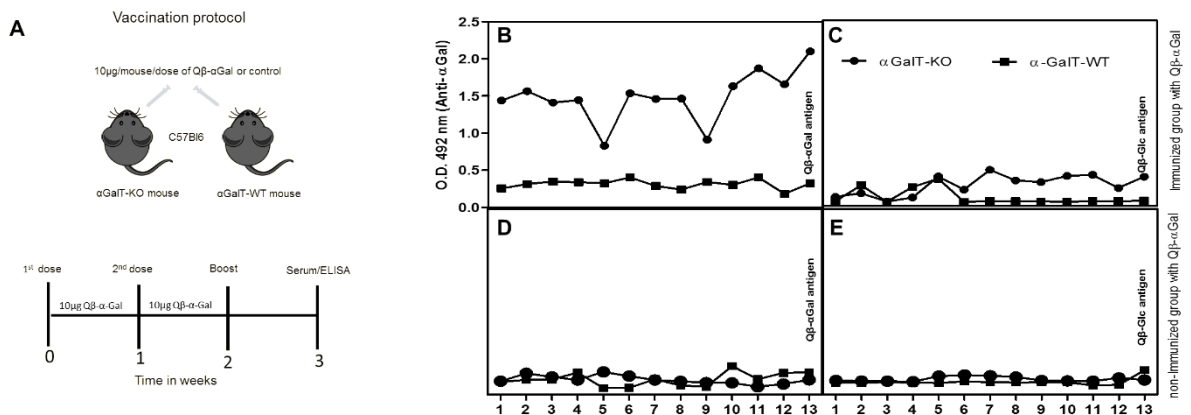


Figure 3. Anti- α -Gal antibody production by immunized mice with Q β - α -Gal antigen. A) Protocol employed to vaccinate α galactosyltransferase Knockout mice. 3 to 7 mice per group were vaccinated with 10 μ g per dose (3 doses) of Q β - α -Gal. One week later serum was separated from collected blood for ELISA, and one week after last immunization all group of mice were infected with 107 of promastigote of *Leishmania infantum* (intraperitoneally) and *Leishmania amazonensis*

(subcutaneously). 10 weeks post-infection, liver and spleen samples were used for load parasite quantification by PCR. Three or more independent experiments were performed in group containing 3 to 7 mice.

Evidencing that the α -GalT-KO mice were able to produce anti- α -Gal antibodies, we proceeded to discover if these immunized mice could be more protected against the *Leishmania* infection. Lately, authors have been shown that anti- α -Gal antibodies can protect against experimental malaria infection²³, burns²⁴, Improvement of immunogenicity for HIV vaccination²⁵, lytic action in *Trypanosoma cruzi* trypomastigote parasites²⁶ and even cancer treatment¹⁹. As we identified the α -Gal epitope on the *L. amazonensis* and *L. infantum* parasite surface, and also we found a small protection in α -GalT-KO mice compared with α -GalT-WT, even with low antibody titers, we raised the hypothesis that α -GalT-KO mice, presenting higher levels of anti- α -Gal antibodies, could develop better protection against *Leishmania* parasites. For this, we established a protocol for vaccination and parasite infection for experimental

leishmaniasis in α -GalT-KO mouse model, figure 4A. Groups of 3-5 mice were vaccinated with Q β - α -Gal particles, one week later, the anti- α -Gal antibody production was tested, and vaccinated mice produced higher levels of IgG anti- α -Gal antibodies, compared with the control, unvaccinated group, as we observed in the figure 4B. After antibody production, mice were infected with 10^7 *L. amazonensis* and *L. infantum*, and qPCR was performed with samples collected of liver and spleen from all groups. Load parasites found in the liver and spleen of vaccinated and infected α -GalT-KO mice with *L. amazonensis* decreased significantly compared with unvaccinated group, as showed in the figures 4C and 4E. Also, the same profile of protection was observed in the liver and spleen of α -GalT-KO vaccinated mice, and infected with *L. infantum*, figures 4D and 4F.

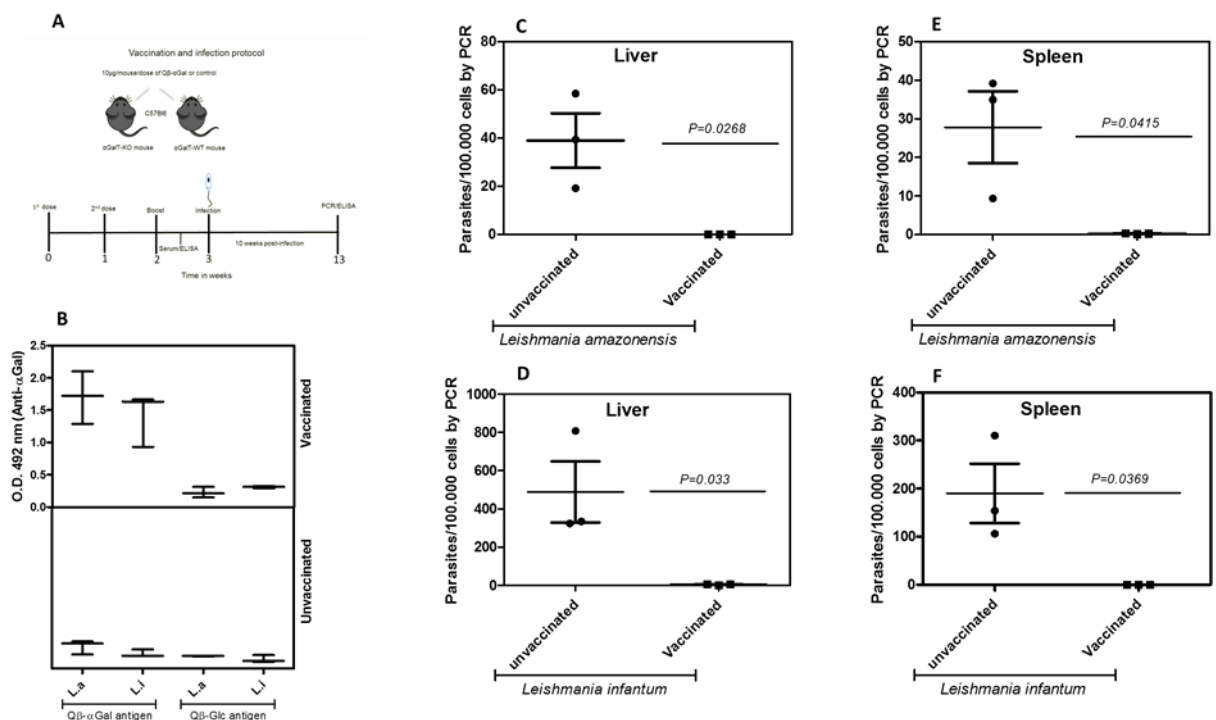


Figure 4. qPCR from immunized non-immunized mice. Parasite load from A) Liver and B) spleen of vaccinated and unvaccinated α -GalT-KO mice infected with 10^7 promastigote form of *Leishmania amazonensis* (subcutaneously); C) liver and D) spleen of vaccinated un-vaccinated α -GalT-KO mice infected with 10^7 promastigote form of *Leishmania infantum* (intraperitoneally); E) Anti- α -Gal antibody produced by vaccinated/unvaccinated and infected mice group 10 weeks post-infection. Three or more independent experiments were performed in groups containing from 3 to 7 mice.

Several functions have been credited to carbohydrates present on *Leishmania* parasite surface. More than a few of these proposed roles of carbohydrates contribute to the immune system evasion and *Leishmania* pathogenesis. In this work we found enough evidences to raise the hypothesis that α -Gal epitope, identified on the *Leishmania* surface, that may cause visceral or cutaneous leishmaniasis, can contribute for the parasite to succeed in the host infection. The mechanism of action of α -Gal epitope and *Leishmania* infection needs to be explored, and

this glycoconjugate may be exploited as target for a new vaccine development against *L. infantum* and *L. amazonensis*.

Methods

A description of Leishmania samples, lysate preparation, SDS, Western blot, immune-affinity purification and detailed methodology is given in the Supplemental Information.

Mice. All animals and experiments were handled in strict accordance with the guidelines of the Research Ethics Committee of the UFMG, approved under the protocol number 137/2011. Female C57Bl/6 mice (6-8 weeks old) having disrupted alleles of the α 1,3-GalT gene (Thall et al., 1995; Milland et al., 2006) (α 1,3GalT-KO) were used. These mice have the H-2b genetic background and are bred and maintained at the animal facility of Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

α -Gal antigen linked to Q β -virus like particle and conjugate preparation. Q β virus-like particles were prepared and purified as described previously (Fiedler et al., 2010; Hong et al., 2009). All particles were characterized by size-exclusion chromatography, dynamic light scattering (Wyatt DynaPro), microfluidic gel electrophoresis (Agilent Bioanalyzer 2100, using Protein 80 chips), and electrospray ionization mass spectrometry on an accurate-mass time-of-flight instrument (Agilent G6230B); representative samples were further examined by transmission electron microscopy and multi-angle light scattering (Malvern Viscotec). In all cases, standard properties of size and composition were observed, with the particles showing narrow size distributions and high protein purity (less than 5% protein impurities detected). Protein concentrations in solution were measured with the BCA method (Protein Reagent kit, Pierce, USA), standardized with bovine serum albumin. For conjugate preparation α -Gal trisaccharide (α -Gal-OH, Carbosynth US, LLC, San Diego, CA) and glucose were converted to their respective alkyne derivatives by Lewis acid-mediated glycosylation of 3-butyn-2-ol. Each alkyne was attached to Q β virus-like particles by a two-step procedure in which the protein nanoparticle was first acylated with an azide-terminated N-hydroxysuccinimide ester and then addressed by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition.

Mice Sensitization for antibodies detection. We initially verified the competence of these α 1,3-GalT-KO mice, previously immunized, to produce antibodies (primarily IgG) against α -Gal epitopes. Immunization was performed using the following protocol: A group of 10 mice were subcutaneously injected with 10 μ g per dose, four doses, one per

week, of the antigen consisting of the bacteriophage Q β virus-like particle (VLP) to which approximately 540 copies of the Gal α 3LN epitope [Q β (Gal α 3LN)540] were attached by covalent chemical ligation as described above. A control group of 10 mice was immunized with unmodified Q β VLP. Mice were sensitized by tick saliva using two methods. A standard protocol for tick feeding on mice using feeding chambers as described by Bouchard and Wikel in 2005 (Bouchard, 2005) was slightly modified, as follows. Groups of 10 mice were anesthetized i.p. with 100 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg of xylazine (Uniao Quimica, Brazil), using a tuberculin syringe (BD Safety-Lok™, USA). Once fully anesthetized, a feeding chamber was assembled at the mice back and two ticks (one male and one female) per mouse were placed into the chamber for 9 days feeding. For artificial inoculation, we injected tick saliva collected as above subcutaneously (20 μ g protein per dose) once per week for four weeks. All mice were humanely euthanized 72 h after the last immunization and the sera were collected for the antibody detection by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as described below.

Fluorescence microscopy and flow cytometry. Cells were fixed for 40 min in 2% paraformaldehyde in 0.1 mM phosphate buffer (pH 7.4), were washed 3 times in phosphate buffer at -20°C for 15 min. Cells were then labeled with 100–200 mg/ml of MOA lectin-fluorescein isothiocyanate (FITC) for 60 min, washed, mounted on slides with Mowiol reagent (DABCO, Sigma a 2,3%), and observed using a fluorescent Nikon Eclipse Ti, (USA), with fluorescence illumination and a FITC filter-barrier system. Pictures were taken with Kodak Tri-X pan 400 ASA film. Lectins conjugated with FITC were obtained from EY laboratories, San Mateo, CA.

Fluorescent signals were quantified using a Becton Dickinson FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA), using an argon laser, excitation wavelength 488 nm, emitted light detector 530 nm (\pm 15 nm), adjusted to a fixed channel using standard Brite Beads (Coulter) prior to determining fluorescence. Samples were briefly vortexed before introduction to sheath fluid. Data acquisition and manipulation were performed with CellQuest and FlowJo versão X.0.7 (Tree Star Inc., Ashland, EUA) All Controls were treated with the appropriate sugar 0.2 M of Galactose.

ASSOCIATED CONTENT

Experimental details methodology is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* Prof. Alexandre F. Marques, e-mail: amarques@icb.ufmg.br; marques.af@outlook.com.

Present Addresses

†If an author's address is different than the one given in the affiliation line, this information may be included here.

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. / All authors have given approval to the final version of the manuscript. / ‡These authors contributed equally. (match statement to author names with a symbol)

Funding Sources

This work was supported in part by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), and by the Georgia Institute of Technology and (R01 CA149451).

Notes

Any additional relevant notes should be placed here.

ACKNOWLEDGMENT

References

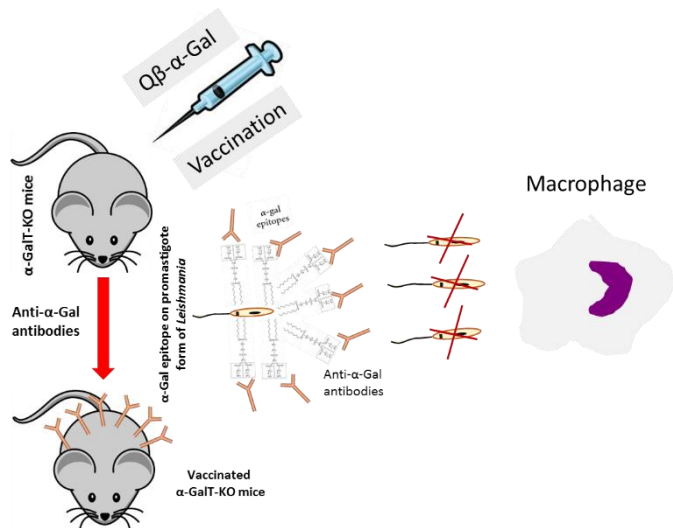
1. Desjeux, P. (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives, *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 27, 305-318.
2. Gohman-Yahr, M. (1994) American mucocutaneous leishmaniasis, *Dermatologic clinics* 12, 703-712.
3. Handman, E. (2001) Leishmaniasis: current status of vaccine development, *Clinical microbiology reviews* 14, 229-243.
4. Hovlid, M. L., Lau, J. L., Breitenkamp, K., Higginson, C. J., Laufer, B., Manchester, M., and Finn, M. G. (2014) Encapsidated atom-transfer radical polymerization in Qbeta virus-like nanoparticles, *ACS nano* 8, 8003-8014.
5. Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., and Saravia, N. G. (2005) Advances in leishmaniasis, *Lancet* 366, 1561-1577.
6. Silveira, F. T., Lainson, R., and Corbett, C. E. (2004) Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 239-251.
7. Naderer, T., Vince, J. E., and McConville, M. J. (2004) Surface determinants of Leishmania parasites and their role in infectivity in the mammalian host, *Current molecular medicine* 4, 649-665.
8. Descoteaux, A., and Turco, S. J. (1999) Glycoconjugates in Leishmania infectivity, *Biochimica et biophysica acta* 1455, 341-352.
9. Desjardins, M., and Descoteaux, A. (1997) Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan, *The Journal of experimental medicine* 185, 2061-2068.
10. Al-Salem, W. S., Ferreira, D. M., Dyer, N. A., Alyamani, E. J., Balghonaim, S. M., Al-Mehna, A. Y., Al-Zubiany, S., Ibrahim el, K., Al Shahrani, A. M., Alkhuailed, H., Aldahan, M. A., Al Jarallah, A. M., Abdelhady, S. S., Al-Zahrani, M. H., Almeida, I. C., and Acosta-Serrano, A. (2014) Detection of high levels of anti-alpha-galactosyl antibodies in sera of patients with Old World cutaneous leishmaniasis: a possible tool for diagnosis and biomarker for cure in an elimination setting, *Parasitology* 141, 1898-1903.
11. Thall, A. D., Maly, P., and Lowe, J. B. (1995) Oocyte Gal alpha 1,3Gal epitopes implicated in sperm adhesion to the zona pellucida glycoprotein ZP3 are not required for fertilization in the mouse, *The Journal of biological chemistry* 270, 21437-21440.
12. Araujo, R. N., Franco, P. F., Rodrigues, H., Santos, L. C., McKay, C. S., Sanhueza, C. A., Brito, C. R., Azevedo, M. A., Venuto, A. P., Cowan, P. J., Almeida, I. C., Finn, M. G., and Marques, A. F. (2016) Amblyomma sculptum tick saliva: alpha-Gal identification, antibody response and possible association with red meat allergy in Brazil, *International journal for parasitology* 46, 213-220.
13. Rempel, B. P., Winter, H. C., Goldstein, I. J., and Hindsgaul, O. (2002) Characterization of the recognition of blood group B trisaccharide derivatives by the lectin from Marasmius oreades using frontal affinity chromatography-mass spectrometry, *Glycoconjugate journal* 19, 175-180.
14. Winter, H. C., Mostafapour, K., and Goldstein, I. J. (2002) The mushroom Marasmius oreades lectin is a blood group type B agglutinin that recognizes the Galalpha 1,3Gal and Galalpha 1,3Galbeta 1,4GlcNAc porcine xenotransplantation epitopes with high affinity, *The Journal of biological chemistry* 277, 14996-15001.
15. Ramoino, P. (1997) Lectin-binding glycoconjugates in Paramecium primaurelia: changes with cellular age and starvation, *Histochemistry and cell biology* 107, 321-329.
16. Wanchoo, A., Lewis, M. W., and Keyhani, N. O. (2009) Lectin mapping reveals stage-specific display of surface carbohydrates in in vitro and haemolymph-derived cells of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana, *Microbiology* 155, 3121-3133.
17. McCoy, J. P., Jr., Varani, J., and Goldstein, I. J. (1984) Enzyme-linked lectin assay (ELLA). II. Detection of carbohydrate groups on the surface of unfixed cells, *Experimental cell research* 151, 96-103.
18. Macher, B. A., and Galili, U. (2008) The Galalpha1,3Galbeta1,4GlcNAc-R (alpha-Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance, *Biochimica et biophysica acta* 1780, 75-88.
19. LaTemple, D. C., Abrams, J. T., Zhang, S. Y., and Galili, U. (1999) Increased immunogenicity of tumor vaccines complexed with anti-Gal: studies in knockout mice for alpha1,3galactosyltransferase, *Cancer research* 59, 3417-3423.
20. Rother, R. P., and Galili, U. (1999) alpha-Gal epitopes on viral glycoproteins, *Sub-cellular biochemistry* 32, 143-172.
21. Galili, U. (2011) Conversion of tumors into autologous vaccines by intratumoral injection of alpha-Gal glycolipids that induce anti-Gal/alpha-Gal epitope interaction, *Clinical & developmental immunology* 2011, 134020.
22. Wigglesworth, K. M., Racki, W. J., Mishra, R., Szomolanyi-Tsuda, E., Greiner, D. L., and Galili, U. (2011) Rapid recruitment and activation of macrophages by anti-Gal/alpha-Gal liposome interaction accelerates wound healing, *Journal of immunology* 186, 4422-4432.
23. Yilmaz, B., Portugal, S., Tran, T. M., Gozzelino, R., Ramos, S., Gomes, J., Regalado, A., Cowan, P. J., d'Apice, A. J., Chong, A. S., Doumbo, O. K., Traore, B., Crompton, P. D., Silveira, H., and Soares, M. P. (2014) Gut microbiota elicits a protective immune response against malaria transmission, *Cell* 159, 1277-1289.
24. Galili, U., Wigglesworth, K., and Abdel-Motal, U. M. (2010) Accelerated healing of skin burns by anti-Gal/alpha-gal liposomes interaction, *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 36, 239-251.
25. Abdel-Motal, U. M., Wang, S., Awad, A., Lu, S., Wigglesworth, K., and Galili, U. (2010) Increased

immunogenicity of HIV-1 p24 and gp120 following immunization with gp120/p24 fusion protein vaccine expressing alpha-gal epitopes, *Vaccine* 28, 1758-1765.

26. Almeida, I. C., Milani, S. R., Gorin, P. A., and Travassos, L. R. (1991) Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti-alpha-galactosyl antibodies, *Journal of immunology* 146, 2394-2400.

Authors are required to submit a graphic entry for the Table of Contents (TOC) that, in conjunction with the manuscript title, should give the reader a representative idea of one of the following: A key structure, reaction, equation, concept, or theorem, etc., that is discussed in the manuscript. Consult the journal's Instructions for Authors for TOC graphic specifications.

Insert Table of Contents artwork here



9.2. Manuscrito submetido e aceito (co-autora)

Virus-like particle display of the α -Gal epitope for diagnostic assessment of Chagas disease

Carlos Ramon Nascimento Brito,^{a,d} Craig S. McKay,^{c,d} Maíra Araújo Azevedo,^a Luíza Costa Brandão Santos,^a Ana Paula Venuto,^a Daniela Ferreira Nunes,^a Daniella Alchaar D'A'vila,^a Gisele Macedo Rodrigues da Cunha,^a Igor Correia Almeida,^b Ricardo Tostes Gazzinelli,^a Lucia Maria Cunha Galvão,^a Egler Chiari,^a Carlos A. Sanhueza,^c M.G., Finn,^{c*} Alexandre Ferreira Marques^{a*}

^aUniversidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^bBorder Biomedical Research Center, Department of Biological Sciences, University of Texas at El Paso, El Paso, TX, 79912, USA

^cGeorgia Institute of Technology, School of Chemistry and Biochemistry, Atlanta, GA, 30332, USA

^dThese investigators contributed equally.

KEYWORDS: *Chagas disease, diagnostics, ELISA, alpha-Gal*

9.3. Artigo publicado (co-autora)

International Journal for Parasitology 46 (2016) 213–220



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

International Journal for Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpara



Amblyomma sculptum tick saliva: α -Gal identification, antibody response and possible association with red meat allergy in Brazil



Ricardo Nascimento Araujo^a, Paula Ferreira Franco^a, Henrique Rodrigues^a, Luiza C.B. Santos^a, Craig S. McKay^b, Carlos A. Sanhueza^b, Carlos Ramon Nascimento Brito^a, Máira Araújo Azevedo^a, Ana Paula Venuto^a, Peter J. Cowan^{c,d}, Igor C. Almeida^e, M.G. Finn^b, Alexandre F. Marques^{a,*}

^a Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Georgia Institute of Technology, School of Chemistry and Biochemistry, Atlanta, GA, USA

^c Immunology Research Centre, St. Vincent's Hospital, Fitzroy, Melbourne, VIC 3065, Australia

^d Department of Medicine, University of Melbourne, Parkville, VIC 3052, Australia

^e Border Biomedical Research Center, Department of Biological Sciences, University of Texas at El Paso, El Paso, TX 79912, USA

9.4. Participação em eventos científicos

- **Worldleish 5- Fifth World Congress Leishmaniasis- Porto de Galinhas- PE (2013).**

Apresentação de poster

Título: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (L) infantum* infection and co-infection experimental model (*Mesocricetus auratus*).

Autores: Venuto A P M., Celeste J L L; Andrade H M; Melo M N ; Oliveira OS.

- **IV Encontro de Pesquisa em Parasitologia – Uma releitura do cenário atual Belo Horizonte-MG (2013).**

Apresentação de Pôster

Título: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (L) infantum* infection and co-infection experimental model (*Mesocricetus auratus*)

Autores: Venuto A P M, Celeste J L L; Andrade H M; Melo M N; Oliveira SS.

- **V Encontro de Pesquisa em Parasitologia: Novas Abordagens para Antigos Problemas- Belo Horizonte-MG (2014).**

Apresentação de Pôsters

Título 1: Avaliação da resposta imune humoral em hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum* isolada e simultaneamente.

Autores: Venuto A P M.; Celeste L L J; Melo M N; Silva S O; Marques A F; Andrade M H.

Título 2: Avaliação clínica e parasitológica em hamsters (*mesocricetus auratus*) infectados por *Leishmania amazonensis*, *Leishmania infantum* e co-infecção.

Autores: Celeste J L; Venuto A P M; França-Silva J C; Silva S O; Melo M N; Andrade, H M.

- **XXX Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e XVIII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses-Uberaba-MG (2014)**

Apresentação de pôster

Título: Avaliação da resposta imune humoral em hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum* isolada e simultaneamente

Autores: Venuto A P M.; Celeste J L L; Oliveira S O, Melo M N; Marques A F, Andrade H M.

- **XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia – SBP e do XXIII Congresso Latinoamericano de Parasitologia-Flap- Salvador- BA (2015).**

Apresentação de pôster.

Título: Avaliação do papel do carboidrato α -gal na infecção experimental por *Leishmania infantum* e *L. amazonensis* em camundongos α -galactosiltransferase knockout.

Autores: Venuto A P M; Marques A F; Andrade H M; Melo M N; Santos, L C B; Ayala, EV Oliveira, Oliveira SS.

• **VI Encontro de Pesquisa em Parasitologia: Educação e Pesquisa: Aplicações na Sociedade - Belo Horizonte-MG (2014).**

Apresentação pôster

Título: Avaliação do papel do carboidrato α -gal na infecção experimental por *Leishmania infantum* e *L. amazonensis* em camundongos α -galactosiltransferase knockout.

Autores: Venuto A P M; Marques A F; Andrade H M; Melo M N; Santos, L C B; Ayala, EV Oliveira, Oliveira SS.

10- ANEXOS

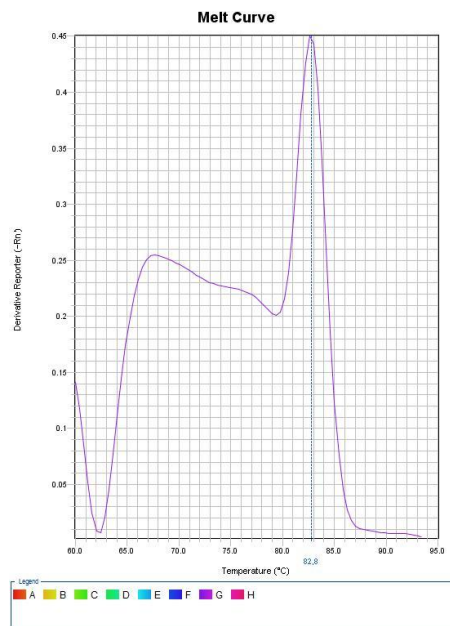
10.1- Anexo 1- Aprovação do projeto pelo CEUA- UFMG

- Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do protocolo experimental utilizado no experimento apresentado no capítulo 1.

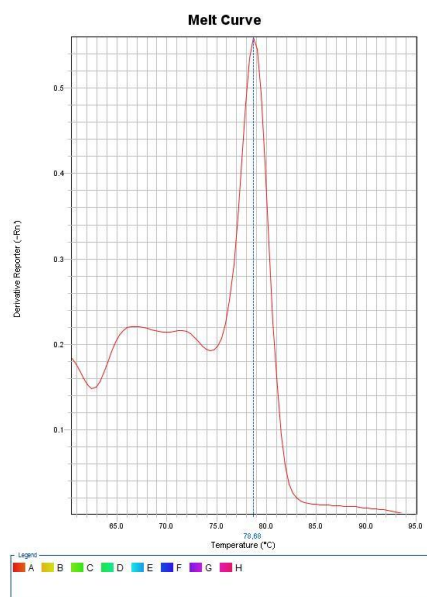
	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p> <p style="text-align: center;">CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p>CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 255 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Avaliação dos Camundongos α1,3galactosyltransferase Knockout (GalT-KO), como Eficientes Modelos Experimentais na Doença de Chagas", que tem como responsável Alexandre Ferreira Marques, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 15/04/2014. Este certificado espira-se em 15/04/2019.</p>	
<p>CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 255 / 2013, related to the Project entitled "LYTIC ANTI-GAL ANTIBODIES PROTECT α1,3-GALACTOSYLTRANSFERASE KNOCKOUT MICE AGAINST Trypanosoma cruzi.", under the supervision of Alexandre Ferreira Marques, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 15/04/2014. This certificates expires in 15/04/2019.</p>	
<p>Jacqueline Isaura Alvarez Leite Coordenador(a) da CEUA/UFMG</p> <p>Belo Horizonte, 15/04/2014.</p> <p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</p>	
<p style="text-align: center;">Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br</p>	

10.2. Anexo 2- Curvas de dissociação dos iniciadores para PCR quantitativa.

a- Curva de dissociação do iniciador do gene DNA polimerase



b- Curva de dissociação do iniciador do gene β actina



REFERÊNCIAS

- Abdel-Motal U M, Guay HM, Wigglesworth K, Welsh RM, Galili U 2007. Increased immunogenicity of influenza virus vaccine by anti-Gal mediated targeting to antigen presenting cells. *J Virol* 81:9131-41.
- Abdel-Motal U M, Wang S, Awad A, Lu S, Wigglesworth K, and Galili U 2010. Increased immunogenicity of HIV-1 p24 and gp120 following immunization with gp120/p24 fusion protein vaccine expressing alpha-gal epitopes. *Vaccine* 28: 1758-1765.
- Abdel-Motal UM, Wigglesworth K, Galili U 2009. Mechanism for increased immunogenicity of vaccines that form in vivo immune complexes with the natural anti-Gal antibody. *Vaccine* 27:3072-82.
- Abranches P, Campino L, Santos-Gomes GM. 1998. Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis. *Acta Med Port* 1(10):871-5.
- Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Cupolilo SMN, Cardoso FO, Souza CSF, Gonçalves da Costa SC 2004. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. *Vet Parasitol* 121: 179-187.
- Ahmed S, Colmenares M et al. 2003. Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun*, 71 (1): 401-10.
- Alexander J & Bryson K, 2005. T helper (h) 1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunology Letters* 99:17–23.
- Almeida IC, Ferguson MA, Schenkman S, Travassos LR 1994. Lytic anti- α -galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 304:793-802.
- Almeida IC, Milani SR, Gorin PA, Travassos LR 1991. Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti- α -galactosyl antibodies. *J Immunol* 146:2394-2400.
- Al-Salem WS, Ferreira DM, Dyer NA, Alyamani EJ, Balghonaim SM, Al-Mehna AY, Saleem A, Ibrahim EK, Shahrani AM, Alkhuailed H, Aldahan AM, Jarallah A, Abdelhady SS, Al-Zahrani MH, Almeida IC, Costa-Serrano A. 2014. Detection of high levels of anti-alpha-galactosyl antibodies in sera of patients with Old World cutaneous leishmaniasis: A possible tool for diagnosis and biomarker for cure in an elimination setting. *Parasitology* 141:1898-1903.

- Alvar J, Molina R, San Andres M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M et al. 1994. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol* 88: 371-378.
- Andrade A, 2002. *Animais de Laboratório* 1-2: 19-24.
- Andrade A, Pinto S, Oliveira R 2006. *Animais de Laboratório Criação e Experimentação*. Rio de Janeiro: Fiocruz.
- Antironi S, Schifanella L, Corbellino M 2012. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:109-118.
- Araujo RN, Franco PF, Rodrigues H, Santos LC, McKay CS, Sanhueza CA, Brito CR, Azevedo MA, Venuto AP, Cowan PJ, Almeida IC, Finn MG, Marques AF 2016. *Amblyomma sculptum* tick saliva: alpha-Gal identification, antibody response and possible association with red meat allergy in Brazil. *International journal for parasitology* 46: 213-220.
- Ashford R, 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonosis. *Int J Parasitol* 15: 17-24.
- Assis RR, Coimbra II, Noronha FS, Turco S J , Soares R P 2012. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum* Modulation of Innate Immune System and Variations in Carbohydrate Structure. *Plos Neglected Tropical Diseases* 6:1543, 2012.
- Avila JL, Rojas M, Garcia L 1988. Persistence of elevated levels of galactosyl-alpha (1-3) galactose antibodies in sera from patients cured of visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 26: 1842-1847.
- Avila JL, Rojas M, Galili U 1989. Immunogenic Gala1-3Gal carbohydrate epitopes are present on pathogenic American *Trypanosoma* and *Leishmania*. *J Immunol* 142:2828-2834.
- Avila JL, Rojas M, Acosta A 1991. Glycoinositol phospholipids from American *Leishmania* and *Trypanosoma* spp: partial characterization of the glycan cores and the human humoral immune response to them. *Journal of clinical microbiology* 29(10):2305-12.
- Awasthi A, Mathur RK, Saha B 2004. Immune response to *Leishmania*. *Indian Journal of Medical Research* 119:238-258.
- Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi J, G Momen, McMahon-Pratt H, Jesus D, Almeida AR, Badaro RB, Barral-Netto R, Carvalho M, Johnson JEM 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 44: 536-546.

- Basu M and Basu S 1973. Enzymatic synthesis of blood group related pentaglycosyl ceramide by an α -galactosyltransferase. *J Biol Chem* 248: 1700-6.
- Beamer WG, Donahue LR, Rosen CJ, Baylink DJ 1996. Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice. *Bone* 18:397-403.
- Berzunza-Cruz MM, Rodriguez-Moreno Á, Gutierrez-Granados G, González-Salazar C, Stephens CR, Hidalgo-Mihart M, Marina CF, Rebollar-Téllez EA, Bailón-Martínez D, Balcells CD, Ibarra-Cerdeña CN, Sánchez-Cordero V, Becker 2015. *Leishmania (L.) Mexicana*. Infected Bats in Mexico: Novel Potential Reservoirs. *PLoS Negl Trop Dis* 9(1): 0003438.
- Betteridge A, Watkins WM 1983. Two α -3-D galactosyltransferases in rabbit stomach mucosa with different acceptor substrate specificities. *Eur. J. Biochem.* 132: 29-35.
- Blake DD, Goldstein IJ 1981. An α -D-galactosyltransferase in Ehrlich ascites tumor cells: biosynthesis and characterization of a trisaccharide (α -D-galactosyl (1-3)-N acetyllactosamine). *J Biol Chem* 256: 5387-93.
- Blanken WM & Van Den Eijnden DH 1985. Biosynthesis of terminal Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R oligosaccharide sequence on glycoconjugates: purification and acceptor specificity of a UDP-Gal: N-acetyllactosamine α 1, 3galactosyltransferase. *J Biol Chem* 260: 12927-34.
- Boggiatto PM, Jie F, Ghosh-Corley KN, Ramer-Tait AE, Jones DE, Petersen CA. 2009. Altered dendritic cell phenotype in response to *Leishmania amazonensis* amastigote infection is mediated by MAP kinase, ERK. *Am J Pathol* 174:1818-1826.
- Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, Vidaud M, Deniau M 2001. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 8(4): 828-31.
- Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM 1995. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol* 155(6):3102-11.
- Calegari-Silva TC, Pereira RM, De-Melo LD 2009. NF-kappa β -mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. *Immunol Lett* 127:19-26.
- Carrión J, Nieto A, Iborra S, Iniesta V, Soto M, Folgueira C, Abanades DR, Requena JM, Alonso C 2006. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunol* 28(5): 173-83.
- Coelho AC, Oliveira JC, Espada C R, Reimão JQ, Trinconi CT, Uliana SRB 2016. A Luciferase-Expressing *Leishmania braziliensis* Line That Leads to Sustained Skin Lesions in

BALB/c Mice and Allows Monitoring of Miltefosine Treatment Outcome. *PLOS Neglected Tropical Diseases* : 1-16.

- Convit J, Ulrich M, Fernandez CT 1993. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87:444-8.
- Costa MM, Andrade HM, Bartholomeu DC, Freitas L, Pires SF, Chapeaurouge AD et al. 2011. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D difference Gel electrophoresis (2-D DIGE) and immunoproteomic: identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine. *J Proteome Res.* 10 (5):2172-84.
- Deak E, Jayakumar A, Cho KW, Goldsmith-Pestana K, Dondji B, Lambris JD McMahon-Pratt D. 2010. Murine Visceral Leishmaniasis: IgM and Polyclonal B-Cell Activation Lead to Disease Exacerbation. *Eur J Immunol.* 40(5):1355-1368.
- Dermine JF, Goyette G, Houde M, Turco SJ, Desjardins M 2005. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. *Cell Microbiol. Sep*;7(9):1263-70.
- Descoteaux A & Turco SJ 1999. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochimica et biophysica acta* 1455(2-3):341-352.
- Desjardins M. & Descoteaux A 1997. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 185, 2061–2068 (1997).
- Dias ES, França-Silva JC, Paz GF, Michalsky EM, Araújo SC, Valadão JL, de Oliveira Lara-Silva F, de Oliveira FS, Pacheco RS, Fortes-Dias CL 2011. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban área of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 176: 101-111.
- Etienne-Decerf J, Malaise M, Mahieu P, Winand R 1987. Elevated anti- α -galactosyl antibody titres. A marker of progression in autoimmune thyroid disorders and in endocrine ophthalmopathy? *Acta Endocrinol* 115:67-74.
- Fagundes DJ & Taha MO 2004. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cirúrgica Brasileira* 19 (1): 59-65.
- Fiedler JD, Brown SD, Lau JL, Finn MG, 2010. RNA-directed packaging of enzymes within virus-like particles. *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 9648-9651.
- Fernandes AP, Costa MMS, Coelho AEF, Michalick MSM, Freitas E, Melo MN, Tafuri WL, Resende DM, Hermont V, Abrantes CF, Gazzinelli RT 2008. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine* 26:5888-5895

- Franco MG 2006. Animais de laboratório - o camundongo. Disponível em URL: <http://www.cobea.org.br/animais.htm>. [14 out 2006].
- Galili U, Rachmilewitz EA, Peleg A, Flechner I. 1984. A unique natural human IgG antibody with anti- α -galactosyl specificity. *J Exp Med* 160: 1519-31.
- Galili U, Buehler J, Shohet SB, Macher BA. 1987 (a). The human natural anti-Gal IgG. The subtlety of immune tolerance in man as demonstrated by crossreactivity between natural anti-Gal and anti-B antibodies. *J Exp Med* 165: 693-704.
- Galili U, Clark MR, Shohet SB, Buehler J, Macher BA 1987(b). Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal alpha 1-3Gal epitope in primates. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 84: 1369-1373.
- Galili U, Mandrell RE, Hamadeh RM, Shohet SB, Griffis JM. 1988. Interaction between human natural anti- α -galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infect Immun* 56:1730-7.
- Galili U & Swanson K 1991. Gene sequences suggest inactivation of α 1-3 galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 88:7401-7404.
- Galili U, Anaraki F, Thall A, Hill-Black C, Radic M 1993. One percent of circulating B-lymphocytes are capable of producing the natural anti-Gal antibody. *Blood* 82:2485-93.
- Galili U, Albertini M, Sondel P, Wigglesworth K, Sullivan M, Whalen G 2010(a). In situ conversion of melanoma lesions into autologous vaccine by intratumoral injections of α -gal glycolipids. *Cancers* 2:773-93.
- Galili U, Wigglesworth K, Abdel-Motal UM 2010(b) Accelerated healing of skin burns by anti-Gal/ α -gal liposomes interaction. *Burns* 36:239-51.
- Galili U 2011. Conversion of tumors into autologous vaccines by intratumoral injection of alpha-Gal glycolipids that induce anti-Gal/alpha-Gal epitope interaction. *Clinical & developmental immunology* ID 134020, 1-10.
- Galili U 2013. Anti-Gal: an abundant human natural antibody of multiple pathogenesis and clinical benefits. *John Wiley & Sons Ltd, Immunology* 140: 1-11.
- Galili U 2015. Significance of the Evolutionary α 1, 3-Galactosyltransferase (GGTA1) Gene Inactivation in Preventing Extinction of Apes and Old World Monkeys. *J Mol Evol* 80:1- 9.
- Garcez L M, Gotob H , Ramosa P K, Brigidoc M C , Gomes P A F, Souza RA, De Luca PM, Mendonça SC, Muniz JA, Shaw JJ. 2002. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* -

induced cutaneous leishmaniasis in the primate *Cebus apella*: a model for vaccine trials. *International Journal for Parasitology* 32: 1755-1764.

- Garg R, Dube A. 2006. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 123(3):439-454.
- Gazzinelli RT, Pereira ME, Romanha A, Gazzinelli G, Brener Z 1991. Direct lysis of *Trypanosoma cruzi*: a novel effector mechanism of protection mediated by human anti-gal antibodies. *Parasite Immunol* 13:345-56.
- Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão RP, Plácido-Pereira RM, Da-Cruz AM 2013. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology* 140: 771-779.
- Gontijo CMF & Melo MN. 2004. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol.* 7 (3): 338-349.
- Guimaraes-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceição-Silva F, Saraiva EM 2009. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(16):6748-53.
- Han W, Cai L, Wu B, Xiao Z, Cheng J, Wang PG 2012. The wciN gene encodes an α -1, 3-galactosyltransferase involved in the biosynthesis of the capsule repeating unit of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B. *Biochemistry* 51:5804-5810.
- Hommel M, Jaffe C, Travi B, Milon G 1995. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann Trop Med Parasitol* 89:55-73.
- Hong V, Presolski SI, Ma C, Finn MG, 2009. Analysis and optimization of copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition for bioconjugation. *Angew Chem Int Ed Engl* 48, 9879-9883.
- Ilgoutz SC, McConville MJ 2001. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int J Parasitol* 31: 899-908.
- Ji J, Sun J, Qi H, Soong L 2002. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am J Trop Med Hyg* 66:338-345.
- Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, Zubairi S, Engwerda CR. 2004. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev* 201: 239-253.
- Kevric I, Cappel M A, Keeling J H 2015. New World and Old World *Leishmania* Infections. *Dermatologic Clinics* 33(3) 579-593.
- Kobets T, Grekov I, Lipoldova M 2012. Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment. *Current Medicinal Chemistry* 19(10):1443-1474.

- Koike C, Fung JJ, Geller DA, Kannagi R, Libert T, Luppi P, Nakashima I, Profozich J, Rudert W, Sharma S, Starzl TE, Trucco M 2002. Molecular basis of evolutionary loss of the α 1, 3-galactosyltransferase gene in higher primates. *J Biol Chem* 277:10114-10120.
- Koike C, Uddin M, Wildman DE, Gray EA, Trucco M, Starzl TE, Goodman M 2007. Functionally important glycosyltransferase gain and loss during catarrhine primate emergence. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:559-564.
- Kuwaki K, Tseng L, Dor FJ Shimizu A, Houser SL, Sanderson TM, Lancos CJ, Prabharasuth DD, Cheng J, Moran K, Hisashi Y, Mueller N, Yamada K, Greenstein JL, Hawley RJ, Patience C, Awwad M, Fishman JA, Robson SC, Schuurman HJ, Sachs DH, Cooper DK. 2005. Heart transplantation in baboons using α 1, 3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med* 11: 29-31.
- Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. 2002. Production of α -1, 3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295:1089-92.
- Lainson R & Shaw JJ 1978. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. *Nature*. 22(273):595-600.
- Lainson R & Rangel EF. 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(8): 811-827.
- Laison R 2010. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amaz Saude* 1(2):13-32.
- LaTemple DC, Abrams JT, Zhang SU, Galili U 1999. Increased immunogenicity of tumor vaccines complexed with anti-Gal: studies in knockout mice for α 1,3 galactosyltransferase. *Cancer Res* 59:3417-23.
- Laurenti MD, Rossi CN, da Matta VL, Tomokane TY, Corbett CE, Secundino NF Pimenta PF, Marcondes M. 2013. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet Parasitol*. 196(3-4):296-300.
- Leon LR 2005. The use of gene knockout mice in thermoregulation studies. *J Therm Biol* 30: 273-88.
- Liu D & Uzonna J E. 2012. The early interaction of *Leishmania* with macrophages, dendritic cells, and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2:1-8.

- Lopez-Kostka S, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, Von Stebut 2009. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol* 182(5):3039-46.
- Louis JA, Conceição-Silva F, Himmelrich H, Tacchini-Cottier F, Launois P 1998. Anti-leishmania effector functions of CD4⁺ Th1 cells and early events instructing Th2 cell development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Adv Exp Med Biol.* 452:53-60.
- Luderitz O, Simmons DA, Westphal G 1965. The immunochemistry of *Salmonella* chemotype VI O-antigens. The structure of oligosaccharides from *Salmonella* group U (o 43) lipopolysaccharides. *Biochem J* 97:820-826.
- Lukasz Kedzierski 2010. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? *J Glob Infect Dis* 2(2): 177-185.
- Mahmoudzadeh-Niknam H, Kiaei SS, Iravanikorean D. 2007. Viscerotropic growth pattern of *Leishmania tropica* in BALB/c mice is suggestive of a murine model for human viscerotropic leishmaniasis. *Journal of Parasitology* 45(4): 247-253.
- Malherbe L, Filippi C, Julia V, Foucras G, Moro M, Appel H, Wucherpfennig K, Guéry JC, Glaichenhaus N 2000. Selective activation and expansion of high-affinity CD4⁺ T cells in resistant mice upon infection with *Leishmania major*. *Immunity* 13(6)771-82.
- Macher A B & Galili U 2008. The Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R (α -Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochim Biophys. Acta* 1780(2): 75-88.
- Mauricio I. L., M. K. Howard., J. R. Stothard, M. A. Miles 1999. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology* 119 : 237 -246.
- Marzochi MCA, Marzochi KBF 1994. Leishmanioses tegumentar e visceral no Brasil - Antropozoonoses emergentes e perspectivas de controle. *Cad. Saúde Pública.* 10 (2): 359-75.
- McConville MJ & Blackwell JM, 1991. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *The Journal of biological chemistry* 266(23):15170-9.
- McConville MJ, Homans SW, Thomas-Oates J E, Dell A, Bacic A. 1990. Structures of the glycoinositolphospholipids from *Leishmania major*. A family of novel galactofuranose-containing glycolipids. *Journal of Biological Chemistry* 265, 7385-7394.
- McConville MJ & Ferguson MA 1993. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *The Biochemical journal* 294 (2):305-324.

- McConville MJ, Schnur LF, Jaffe C, Schneider P 1995. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochemical Journal* 310:807-818.
- Milland J, Christiansen D, Lazarus BD, Taylor SG, Xing PX, Sandrin MS 2006. The molecular basis for gal alpha (1, 3) gal expression in animals with a deletion of the alpha1, 3galactosyltransferase gene. *J Immunol* 176, 2448-2454.
- Ministério da Saúde, 2016. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde.
- Ministério da Saúde, 2007. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2ª edição atualizada. Série A. Normas e manuais técnicos.
- Miralles GD, Stoeckle MY, McDermott DF, Finkelman FD, Murray HW 1994. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 62(3):1058-63.
- Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA Lucientes J, Alvar J. 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 88 (4): 491-3.
- Monteiro R, Brandau R, Gomes WJ, Braile DM 2009. Tendências em experimentação animal. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 24(4): 506-513.
- Mougneau E, Bihl F, Glaichenhaus N 2011. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunological reviews* 240(1)286-96.
- Mukbel RM, Patten C Jr, Gibson K, Ghosh M, Petersen C, Jones DE 2007. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am J Trop Med Hyg* 76:669-675.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366 (9496):1561-77
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9(6):255-62.
- Ng LG, Hsu A, Mandell MA, Roediger B, Hoeller C, Mrass P, Iparraguirre A, Cavanagh LL, Triccas JA, Beverley SM, Scott P, Weninger W. 2008. Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *PLoS pathogens* 4(11):e1000222.
- Oliveira CI, Barral-Netto M 2005. O modelo experimental nas infecções causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. *GM Bahia* 75: 35-45.

- Oliveira Ed, Oshiro ET, Pinto RV, Castro BC, Daniel KB, Oliveira JM, Júnior MS, Guimarães EB, Silva JM, Dorval ME. 2011. Presence of amastigotes in the central nervous system of hamsters infected with *Leishmania sp.* *Rev Bras Parasitol Vet* 20(2):97-102.
- Pereira-Chioccola VL, Acosta-Serrano A, Correia de Almeida I, Ferguson MA, Souto-Padron T, Rodrigues MM, Travassos LR, Schenkman S 2000 .Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *J Cell Sci.* 113 (7):1299-307.
- Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. 2008. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321(5891): 970-4.
- Phelps CJ, Koike C, Vaught TD et al. 2003. Production of α 1, 3-galactosyltransferase deficient pigs. *Science* 299:4-4.
- Podinovskaia M; Descoteaux A 2015. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future microbiology* 10(1) 111-29.
- Posekany KJ, Pittman HK, Bradfield JF, Haisch CE, Verbanac KM 2002. Induction of cytolytic anti-Gal antibodies in α -1,3-galactosyltransferase gene knockout mice by oral inoculation with *Escherichia coli* O86:B7 bacteria. *Infect Immun* 70:6215-6222.
- Puentes SM, Da Silva RP, Sacks DL, Hammer CH, Joiner KA 1990. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J Immunol* 145(12) 4311-6.
- Qi H, Ji J, Wanasen N, Soong L 2004. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 72:988-995.
- Ramasamy R & Field MC 2012. Terminal galactosylation of glycoconjugates in *Plasmodium falciparum* asexual blood stages and *Trypanosoma brucei* bloodstream trypomastigotes. *Exp Parasitol* 130:314-20.
- Reithinger R & Dujardin JC 2007. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Status and Future Applications. *Journal of Clinical Microbiology* 45(1):21-25.
- Ribeiro-Gomes FL & Sacks D 2012. The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2:1-8.
- Ribeiro-Romão RP, Moreira OC, Osorio EY, Cysne-Finkelstein L, Gomes-Silva A, Valverde JG, Pirmez C, Da-Cruz AM, Pinto EF 2014. A comparative evaluation of lesion

development, tissue damage and cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania (Viannia) braziliensis* concentrations. *Infect Immun* 82(12):5203-13.

- Ronet C, Hauyon-La Torre Y, Revaz-Breton M, Mastelic B, Tacchini Cottier F, Louis J, Launois P. 2010. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. *J Immunol* 184(2):886-894.
- Ross, R 1903. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and further notes on Leishman's bodies. *Brit Med J* 2:1261-1401.
- Sacks D & Noben-Trauth N 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice *Nature Reviews Immunology* 2: 845-858.
- Sacks DL & Melby PC 2015. Animal Models for the Analysis of Immune Responses to Leishmaniasis. *Current Protocols in Immunology* 19(2):1-24.
- Sacks DL, Pimenta PF, McConville MJ, Schneider P, Turco SJ 1995. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *The Journal of experimental medicine* 181(2):685-97.
- Schneider P, Rosat JP, Bouvier J, Louis J, Bordier C 1992. *Leishmania major*: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. *Exp Parasitol* 75(2) 196-206.
- Schneider P, Schnur LF, Jaffe CL, Ferguson MA, McConville MJ 1994. Glycoinositol-phospholipid profiles of four serotypically distinct Old World *Leishmania* strains. *The Biochemical Journal* 304 (2):603-9.
- Schocker NS, Portillo S, Brito CR, Marques AF, Almeida IC, Michael K 2016. Synthesis of Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -, Gal β (1,4)GlcNAc α - and GlcNAc-containing neoglycoproteins and their immunological evaluation in the context of Chagas disease. *Glycobiology* 26(1):39-50.
- Schönián G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presbe W, Jaffe CL, 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47:349-358.
- Scott P & Scharton I. 1994. Interaction between the innate and the acquired immune system following infection of different mouse strains with *Leishmania major*. [Ann N Y Acad Sci](#). 15;730:84-92.

- Shaw JJ 2007. The leishmaniasis, survival and expansion in a changing world. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102: 541-547.
- Silva MV 2005. *Avaliação de testes sorológicos para Leishmaniose visceral canina utilizando coleta de amostra sanguínea em papel de filtro*, Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto-MG, 193 p.
- Silveira FT, Lainson R, Corbett C. 2004. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 99(3): 239-251
- Soares RP, Cardoso TL, Barron T, Araujo MS, Pimenta PF, Turco SJ 2005. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *International journal for parasitology* 35(3):245-53.
- Soares RP, Macedo ME, Ropert C, Gontijo NF, Almeida IC, Gazzinelli RT, Pimenta PF, Turco SJ 2002. *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Molecular and biochemical parasitology* 121(2):213-24.
- Soliman MFM 2006. The persistence, dissemination, and visceralization tendency of *Leishmania major* in Syrian hamsters. *Acta Tropica* 97: 146-150.
- Späth GF, Lye LF, Segawa H, Sacks DL, Turco SJ, Beverley SM. 2003. Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient *Leishmania major*. *Science* 29; 301(5637):1241-3.
- Stockdale L & Newton R, 2013. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. *Plos Negl Trop Dis* 7: e2278.
- Strable E, Finn MG, 2009. Chemical modification of viruses and virus-like particles. *Curr Top Microbiol Immunol* 327, 1-21.
- Tearle RG, Tange MJ, Zannettino ZL, Katerelos M, Shinkel TA, Van Denderen, BJ, Lonie AJ, Lyons I, Nottle MB, Cox T, Becker C, Peura AM, Wigley PL, Crawford RJ, Robins AJ, Pearse MJ, D'Apice AJ, 1996. The alpha-1, 3- galactosyltransferase knockout mouse. Implications for xenotransplantation. *Transplantation* 61:13-19.
- Terabe M, Kuramochi T, Hatabu T, Ito M, Ueyama Y, Katakura K, Kawazu S, Onodera T, Matsumoto Y. 1999. Non-ulcerative cutaneous lesion in immuno-deficient mice with *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitol Int.* 48:47-53.

- Thall AD, Maly P, Lowe JB, 1995. Oocyte Gal alpha 1,3 Gal epitopes implicated in sperm adhesion to the zona pellucida glycoprotein ZP3 are not required for fertilization in the mouse. *J Biol Chem.* 270:21437-21440.
- Tolezano JE, Uliana SR, Taniguchi HH, Araújo MF, Barbosa JA, Barbosa JE, Floeter-Winter LM, Shaw JJ. 2007. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol* 149(3-4):280-4.
- Towbin H, Rosenfelder G, Wieslander J et al.1987. Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas disease, American cutaneous leishmaniasis, and normal individuals recognize terminal galactosyl (α 1-3)-galactose epitopes. *J Exp Med* 66:419-32.
- Travassos LR, Almeida IC 1993. Carbohydrate immunity in American trypanosomiasis. *Springer Semin Immunopathol* 15:183-204.
- Turco SJ 2003. Trypanosomatid surface and secreted carbohydrates. In: Molecular Medical Parasitology. Elsevier Science Ltd. 225-40.
- Ueno N & Wilson M E 2012. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends Parasitol* 28(8): 335-44.
- Van Zandbergen G., Klinger M, Mueller A., Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *Journal of immunology* 6521- 5.
- Von Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, Udey MC. 1998. Uptake of *Leishmania* major amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *The Journal of experimental medicine* 188(8):1547-52.
- Von Stebut E, Ehrchen JM, Belkaid Y, Kostka SL, Molle K, Knop J, Sunderkotter C, Udey MC.2003. Interleukin 1alpha promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice. *The Journal of experimental medicine* 198(2):191-9, 21.
- Waterston et al. 2002 <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html> (Mouse Genome Sequencing Consortium), "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome," *Nature*, 420:520-62.
- WHO Leishmaniasis control programme. Annual country reports, 2013
- WHO, 2016 - World Health Organization. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em Julho de 2016.

- Who-Paho 2013. Leishmaniases: Epidemiological Report of the Americas. Report Laishmaniasis 1:1-4.
- Wigglesworth KM, Racki WJ, Mishra R, Szomolanyi-Tsuda E, Greiner DL, Galili U 2011. Rapid recruitment and activation of macrophages by anti-Gal/alpha-Gal liposome interaction accelerates wound healing. *Journal of immunology* 186, 4422-4432.
- Wilson ME, Jeronimo SM, Pearson RD 2005. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog* 38(4):147-60.
- Yilmaz B, Portugal S, Tran TM, Gozzelino R, Ramos S, Gomes J, Regalado A, Cowan PJ, d'Apice AJ, Chong AS, Doumbo OK, Traore B, Crompton PD, Silveira H, Soares MP 2014. Gut Microbiota Elicits a Protective Immune Response against Malaria Transmission. *Cell* 159, 1277–1289.