

LARISSA FERREIRA PARANAIBA

Leishmania enriettii: caracterização preliminar dos lipofosfoglicanos e glicoinositolfosfolípides e infectividade para *Cavia porcellus*

BELO HORIZONTE

2014

LARISSA FERREIRA PARANAIBA

Leishmania enriettii: caracterização preliminar dos lipofosfoglicanos e glicoinositolfosfolípidos e infectividade para *Cavia porcellus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Parasitologia.

Orientador: Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares

Co-orientador: Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo

BELO HORIZONTE

2014

Agradecimentos

O símbolo do curso de Ciências Biológicas é representado por um óvulo sendo fecundado, determinando o princípio da vida. Bem como o símbolo do meu curso estou nesse momento começando a minha vida profissional, com vários desafios e novidades que nunca me deparei até nesse momento.

Nesse dia muito especial agradeço a Deus, pela saúde, paciência e sabedoria que me fez saber escolher o melhor caminho.

Agradeço profundamente a minha mãe Regina, meu pai Jurandir, meu namorado Fabrício e aos meus irmãos Paty e Rei e a todos meus familiares que estão tão longe e mesmo assim conseguiram me apoiar, amar e encorajar.

Agradeço ao Rodrigo Soares e Nelder Gontijo, que foram verdadeiramente e muito presentes orientadores, que me deram a oportunidade de trabalhar com a parasitologia, me ensinaram toda a parte de bancada de laboratório e sempre tiveram uma opinião e sugestão para o trabalho.

Com muito carinho agradeço aos meus verdadeiros amigos de BH, Diamantina e Ipatinga, que tanto me ajudaram, escutaram, estudaram e foram meus companheiros.

A turma Lado B – Parasitologia 1/2012, que sem eles nunca poderia ter sobrevivido as varias disciplinas no inicio do curso de mestrado e que mesmo a distância sempre estiveram presentes nos momentos mais especiais.

Aos colegas de laboratório de fisiologia de insetos hematófagos, LBDM e Leishmanioses que me deram suporte e apoio. Em especial Patrícia Martins Parreiras, Tatiane Figueiredo de Moraes Panini, Rafael Ramiro de Assis, Ana Carolina Souza Gabrich, Antonio F. Mendes, Paula Monalisa Nogueira, Amanda Cardoso de Oliveira Silveira, Maria Norma Melo, Soraia de Oliveira Silva e Frederico de Rezende Lima.

Agradeço o Programa de pós-graduação em parasitologia da UFMG e sobretudo as secretárias Sumara e Cibele, que sempre me atenderam tão bem e me deram suporte.

“Aonde chegamos depende de quanto libertarmos a arte de pensar”.

(Augusto Cury, 2003)

Obrigada!

RESUMO

A *Leishmania enriettii* é uma espécie não infectante ao homem que tem como hospedeiro vertebrado a cobaia *Cavia porcellus*. Alguns aspectos da interação parasito-hospedeiro neste modelo ainda são desconhecidos principalmente envolvendo moléculas de superfície do parasito. Vários Lipofosfoglicanos (LPGs) e glicoinositolfosfolípides (GIPLs) de espécies de *Leishmania* do Novo e Velho Mundo já foram descritas, porém aspectos da glicobiologia de *L. enriettii* ainda são desconhecidos. Neste estudo, caracterizou-se preliminarmente os LPGs e GIPLs de duas cepas de *L. enriettii* (L88 e Cobaia) isoladas de seus hospedeiros vertebrados em 1945 e 1985, respectivamente. Além disso, foi avaliado o papel destas moléculas *in vitro* na interação com macrófagos murinos e sua infectividade *in vivo* em *Cavia porcellus*. Os LPGs foram extraídos, purificados e analisados por western-blot mostrando que o LPG da cepa L88 apresentou maior peso molecular. Os LPGs e GIPLs foram despolimerizados e seus açúcares foram analisados através da eletroforese de carboidratos. A região de unidades repetitivas dos LPGs das duas cepas não apresentou cadeias laterais, sendo representado pelo dissacarídeo Gal(β 1,4)Man(α 1)-PO₄. O GIPL da cepa L88 apresentou galactose em sua estrutura, similar ao GIPL do tipo II. O GIPL da cepa Cobaia apresentou uma abundância de glicose, uma característica ainda não observada. Os polimorfismos observados nos LPGs e GIPLs foram avaliados *in vitro* em macrófagos murinos. Para se avaliar que tipo de receptor estava sendo reconhecido por LPGs e GIPLs das duas cepas, macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e knock-out (TLR2 -/- e TLR4 -/-), foram primados com IFN- γ e estimulados com os glicoconjugados e seus respectivos parasitos vivos (MOI 10:1). Nenhuma ativação de NO ou citocinas foi observada com os parasitos vivos. Por outro lado, os LPGs e GIPLs foram capazes de ativar a produção de NO e citocinas (IL-6, IL-12 e TNF - α), sendo que os LPGs foram agonistas mais potentes que os GIPLs, preferencialmente via TLR2 e secundariamente via TLR4. Para se avaliar isoladamente o papel de cada TLR, foram utilizadas células de ovário de hamster chinês (CHO). Neste modelo, foi observado que os LPGs e os GIPLs não foram capazes de ativar TLR2 e TLR4, sugerindo uma co-participação dos dois receptores. Para se avaliar a infectividade das duas cepas, foram utilizados cobaias machos da espécie *Cavia porcellus*. Estes animais foram inoculados com parasitos das duas cepas na presença ou não de extrato de glândula salivar do flebotomíneo (GSF) *Lutzomyia longipalpis* e avaliados semanalmente por 91 dias. Os

animais infectados começaram a desenvolver protuberância e/ou lesão a partir da 4^a e 5^a semana de infecção, mas apenas a cepa L88 foi capaz de causar lesões ulceradas. O tamanho, o tempo de desenvolvimento e de cicatrização foi maior quando os parasitos foram inoculados na presença de GSF ($p < 0,01$). Em síntese, a cepa L88 de *L. enriettii* apresentou um LPG de longa cadeia e um GIPL do tipo II, o que resultou em um perfil mais pró-inflamatório do que a cepa Cobaia. Estes resultados *in vitro* foram confirmados *in vivo*, onde a cepa L88 foi capaz de desenvolver lesão ulcerativa.

ABSTRACT

Leishmania enriettii is a non-infectious species to man, whose reservoir is *Cavia porcellus*. Some aspects of the parasite-host interaction in this model are still unknown, especially aspects involving parasite surface molecules. Many Lipophosphoglycans (LPGs) and glycoinositolphospholipids (GIPLs) of species from the Old and New World have already been described. However, some glicobiology aspects of *L. enriettii* are still unknown. In this study, we have preliminarily characterized the LPGs and GIPLs from two strains of *L. enriettii* (L88 and Cobaia) isolated from their vertebrate hosts in 1945 and 1985, respectively. Moreover, the role of those molecules was evaluated during *in vitro* interaction with mice peritoneal macrophages and Chinese Hamster's ovary cells (CHO). Additionally, their infectivity was evaluated *in vivo* in *Cavia porcellus*. LPGs were extracted, purified and analysed by western-blot, showing that LPG from type L88 was longer than that of Cobaia strain. LPGs and GIPLs were depolymerized and their sugar was analysed through electrophoresis of carbohydrates. The region of repetitive units of the two types of LPGs did not present lateral chains, being represented by disaccharide Gal(β 1,4)Man(α 1)-PO₄. The GIPL of the strain L88 presented galactose in its structure, similar to GIPL of type II. On the other hand, the GIPL of Cobaia strain presented an abundance of glucose, a characteristic not yet observed. In order to evaluate the type of receptor recognized by LPGs and GIPLs, mice peritoneal macrophages of C57BL/6 and Knock-out (TLR2 $-/-$ and TLR4 $-/-$) were primed with IFN- γ and stimulated with glycoconjugates and their respective live parasites (MOI 10:1). No activation of NO or cytokines was observed with live parasites. On the other hand, LPGs and GIPLs were able to activate the production of NO and cytokines (IL-6, IL-12 and TNF- α). Furthermore, LPGs were more powerful agonists than GIPLs, preferably via TLR2 and secondarily via TLR4. To evaluate separately the role of each TLR, we used CHO cells. In this model, it was observed that LPGs and GIPLs were not able to activate neither TLR2 nor TLR4, suggesting a co-participation of both receptors. In order to evaluate the infectivity the two strains, male guinea pigs (cobaia) of the species *Cavia porcellus* were used. These animals were inoculated with parasites of the two strains in the presence or absence of the salivary gland extract (GSF) from the sandfly *Lutzomyia longipalpis* and evaluated weekly for 91 days. The infected animals started to develop protuberance and/or lesion in the 4th and 5th week after the infection. But only L88 strain developed ulcerated lesions. Size,

development and scaring time were greater when the parasites were inoculated in the presence of GSF ($p < 0.01$). In conclusion, the L88 strain of *L. enriettii* exhibited a longer LPG and GIPL type II. Those features may be related to a more pro-inflammatory profile than the Cobaia strain. Those *in vitro* data were confirmed *in vivo*, where L88 species was able to develop ulcerated lesions.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. As Leishmanioses	1
1.2. <i>Leishmania enriettii</i>	2
1.3. Aspectos da interação <i>Leishmania</i> -hospedeiro	5
1.4. Os glicoconjugados de <i>Leishmania</i>	6
1.5. Os glicoinositolfosfolípides (GIPLs) de <i>Leishmania</i>	6
1.6. Os lipofosfoglicanos (LPGs) de <i>Leishmania</i>	8
1.7. Os glicoconjugados de <i>Leishmania</i> e a interação com hospedeiros vertebrados 10	
2. JUSTIFICATIVA.....	14
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo geral	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1. Cepas de <i>Leishmania enriettii</i> e condições de cultivo.....	18
4.2. Extração do LPG e GIPLs	19
4.3. Purificação dos LPGs e GIPLs	20

4.4.	Dosagem do LPGs e GIPLs	21
4.5.	Análise da purificação do LPG usando a técnica de <i>Western-blot</i>	22
4.6.	Caracterização preliminar das unidades repetitivas das formas procíclicas de <i>Leishmania enriettii</i>	23
4.7.	Eletroforese de carboidratos – FACE (<i>Fluorophore-assisted carbohydrate electroforesis</i>)	24
4.8.	Eletroforese de monossacarídeos – FACE (<i>fluorophore-assisted carbohydrate electroforesis</i>)	26
4.9.	Produção de NO e citocinas em macrófagos murinos	29
4.10.	Translocação de NF-kB	31
4.11.	Experimento <i>in vivo</i> em cobaias	32
4.12.	Análise estatística	35
5.	RESULTADOS	37
5.1.	Curva de crescimento	37
5.2.	Purificação do LPG	37
5.3.	Análise do perfil das unidades repetitivas dos LPGs	38
5.4.	Identificação de monossacarídeos dos GIPLs	39
5.5.	Análise da produção de NO em macrófagos murinos	40
5.6.	Análise da produção de citocinas em macrófagos murinos	41
5.7.	Análise da translocação de NF-kB por LPGs e GIPLs	43
5.8.	Infecção em <i>Cavia porcellus</i> usando duas cepas de <i>L.enriettii</i>	47
6.	DISCUSSÃO	53

7. CONCLUSÕES.....	63
8. REFERÊNCIAS:	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Provável ciclo esquemático da <i>Leishmania enriettii</i>	4
Figura 2. Representação esquemática dos diferentes tipos de glicoinositolfosfolípides (GIPLs).....	8
Figura 3. Estrutura bioquímica básica da molécula lipofosfoglicano..	9
Figura 4. Esquema da representação da extração e purificação dos LPGs e GIPLs das duas cepas de <i>L. enriettii</i> ..	20
Figura 5. Esquema da representação da montagem do gel no aparelho de transferência (Semi-Dry Bio-Rad Trans-Blot®SD semi dry transfer cell).....	23
Figura 6. Esquema de fracionamento do LPG.....	26
Figura 7. Esquema de fragmentação do GIPL.....	28
Figura 8. Representação esquemática dos tubos eppendorfs utilizados para a infecção e divisão dos grupos dos animais infectados no experimento de infecção <i>in vivo</i>	34
Figura 9. Curvas de crescimento tempo dependente das formas promastigotas de cepas de <i>L. enriettii</i> (cepa Cobaia e L88) em meio M199.....	37
Figura 10. Western-blot de LPG purificado (10µg) de <i>L. enriettii</i> (cepas Cobaia e L88) e <i>L. infantum</i> (BH46) em presença do anticorpo CA7AE (1:1000).....	38
Figura 11. Perfil das unidades repetitivas do LPG das cepas de <i>L. enriettii</i> (L88 e Cobaia) visualizados sob luz UV..	39
Figura 12. Perfil de monossacarídeos das cepas de <i>L. enriettii</i> (L88 e Cobaia).....	40

Figura 13. Produção de nitrito em macrófagos intraperitoneais murinos (C57Bl/6 TLR2 (-/-) e TLR4 (-/-)) primados com IFN- γ estimulados com LPGs (10 μ g/mL), GIPLs (10 μ g/mL) e culturas de promastigotas (MOI 10:1) das cepas L88 e Cobaia de <i>L. enriettii</i> 48 horas.	41
Figura 14. Produção de TNF- α em macrófagos intraperitoneais murinos (C57Bl/6 TLR2 (-/-) e TLR4 (-/-)) primados com IFN- γ estimulados com LPGs (10 μ g/mL), GIPLs (10 μ g/mL) e culturas de promastigotas (MOI 10:1) das cepas L88 e Cobaia de <i>L. enriettii</i> 48 horas.....	42
Figura 15. Produção de IL-6 e IL-12 p40 em macrófagos intraperitoneais murinos (C57Bl/6 TLR2 (-/-) e TLR4 (-/-)) primados com IFN- γ estimulados com LPGs (10 μ g/mL), GIPLs (10 μ g/mL) e culturas de promastigotas (MOI 10:1) das cepas L88 e Cobaia de <i>L. enriettii</i> 48 horas.	43
Figura 16. LPGs purificados a partir de duas cepas de <i>Leishmania enriettii</i> (L88 e Cobaia) induzindo a translocação de NFkB através de TLRs.....	45
Figura 17. GIPLs purificados a partir de duas cepas de <i>Leishmania enriettii</i> (L88 e Cobaia) induzindo a translocação de NF-kB através de TLRs.....	46
Figura 18. Avaliação do peso do grupo 1 (infectados com <i>L.enriettii</i> cepa L88) e grupo 2 (infectados com <i>L.enriettii</i> cepa L88 + GSF).....	47
Figura 19. Avaliação do peso do grupo 3 (infectados com <i>L.enriettii</i> cepa Cobaia) e grupo 4 (infectados com <i>L.enriettii</i> cepa Cobaia + GSF).....	48
Figura 20. Curso do surgimento e cicatrização das lesões.	49

Figura 21. Curva de desenvolvimento de lesão em cobaias do grupo 1(Grupo de cobaias infectados com *L. enriettii* cepa L88) e do grupo 2 (Grupo de cobaias infectados com *L. enriettii* cepa L88 + GSF)..... 50

Figura 22. Diagrama esquemático do LPG de *L. enriettii* procíclicas.. 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Soluções para o preparo dos géis de resolução e concentração (poliacrilamida 12%)*:.....	22
Tabela 2. Condições técnicas da eletroforese*	25
Tabela 3 Condições técnicas da eletroforese*	28
Tabela 4. Dados do desenvolvimento de protuberância e/ou lesão nos <i>Cavia porcellus</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – grau Celsius

AMAC – 2-aminoacridona

CBA – Ensaio com bead por citometria (*Cytometric Bead Array*)

CD – Grupos de diferenciação

CE – Eletroforese capilar

CHO – Célula de ovário de hamster chinês

FACE – Eletroforese de carboidrato (*Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis*)

Gal – Galactose

Gal_f – Galactofuranose

GIPLs – Glicoinositol-fosfolípidos

Glc – Glicose

gp63 – Glicoproteína 63

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

GSF – Glândula salivar de Flebotominéo

IFN- γ – Interferon gama

IL – Interleucina como exemplo: Interleucina 10, Interleucina 12 e Interleucina 4.

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

LC – Leishmaniose cutânea

LCD – Leishmaniose cutânea difusa

LMC – Leishmaniose muco-cutânea

LPG – Lipofosfoglicano

LPS – Lipopolissacarídeo

LT– Leishmaniose tegumentar

LV – Leishmaniose visceral

M199 – Meio 199

Man – Manose

mg – Miligrama

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MØ – Macrófago

MyD88 – Fator de diferenciação mielóide 88

NADPH – Enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase

NETs – Redes extracelulares de neutrófilos (*neutrophil extracellular traps*)

NF- κB – Fator nuclear kapa B

NK – Células *natural killer*

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAMPs – Padrões moleculares associados à patógenos

PBS – Tampão fosfato/salina (“Phosphate Buffer Saline”)

PG – Fosfoglicano

PKC – Proteína cinase C

PO4 – Fosfato

PPGs – Proteofosfoglicanos

RPMI – Meio de cultura (Roswell Park Memorial Institute)

sAP – Fosfatase ácida secretada

SFB – Soro Fetal Bovino

TGF- β – Fator de Crescimento Transformante beta

THF – Tetraidrofurano

TLR – Receptor do tipo Toll (*Toll Like Receptor*)

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

WB – *Western blotting*

WT – *Wild-type*



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. As Leishmanioses

As Leishmanioses são doenças causadas por protozoários pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (Ross, 1903; Kaye & Scott, 2011). A transmissão ocorre quando a fêmea do flebotomíneo realiza seu repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado. O protozoário tem a capacidade de infectar roedores, marsupiais, canídeos, edentados e primatas (Grimaldi et al., 1989). Os hospedeiros invertebrados são dípteros da família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*. No Velho Mundo pertencem ao gênero *Phlebotomus* e no Novo Mundo ao gênero *Lutzomyia* (Young & Duncan 1994).

As Leishmanioses podem ser divididas em duas formas clínicas principais: a Leishmaniose Tegumentar (LT) e a Leishmaniose Visceral (LV). Nas Américas, a LT possui três variedades de formas clínicas: a Leishmaniose Cutânea (LC), a Leishmaniose Mucocutânea (LMC) e a Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) (Dejeux, 2004).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) as Leishmanioses são consideradas antroponozoses, integrando o conjunto das seis doenças tropicais mais importantes em todo mundo (Guerra et al., 2007). Cerca de 90% dos casos clínicos de LV e LC, concentram-se em países como Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil e Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria, respectivamente (WHO, 2002). Estima-se que 12 milhões de indivíduos estejam infectados e cerca de 350 milhões de pessoas estejam em risco de adquirir a infecção, especialmente nos países em desenvolvimento (WHO, 2002).

No Brasil, o grande número de casos de Leishmaniose é causado principalmente pelas espécies *Leishmania braziliensis* para LT e LMC e *Leishmania infantum* para LV. A LT é caracterizada por lesões localizadas, que se curam espontaneamente, enquanto a LMC causa lesões graves desfigurantes comprometendo a mucosa da boca, nariz e garganta (Dantas-Torres et al., 2012). A LV acomete órgãos internos, como medula óssea, baço e fígado e pode levar à morte se não tratada (Kaye & Akira, 2011). Entretanto, existem espécies pouco estudadas que não são patogênicas ao homem. Neste grupo podemos citar a *Leishmania enriettii* (Muniz & Medina, 1948).

1.2. *Leishmania enriettii*

Existem mais de 30 espécies de *Leishmania* no Novo Mundo, sendo que destas 20 espécies já são conhecidas como infectante ao homem (Lainson & Shaw, 1997). Um exemplo de espécie já comprovada não infectante ao homem é a *Leishmania enriettii* (Muniz & Medina, 1948; Machado et al., 1994), que tem hospedeiro vertebrado a espécie *Cavia porcellus* ou cobaias (Muniz & Medina, 1948) (Figura 1). Lainson & Shaw (1997) classificaram a *L. enriettii* dentro do subgênero *Leishmania*, o qual apresenta desenvolvimento suprapilárico.

Em 1946, Medina, pela primeira vez, observou lesões em cobaias infectadas no Instituto de Biologia e Pesquisa Tecnológica em Curitiba na escola de Agronomia e Veterinária da Universidade Federal do Paraná. Muniz & Medina (1948) nomearam esse parasito como *L. enriettii*. Nesse mesmo trabalho, os autores observaram formas amastigotas nas lesões na pele e focinho das cobaias. Os mesmos autores tentaram infectar outros tipos de hospedeiros incluindo macacos, cachorros e preás (*Cavia aperea*) não obtendo sucesso em nenhum modelo. O trabalho de Medina (1948) foi criticado por Lainson e colaboradores (1979) que sugeriram que a falha da não observação de infecção aparente

em *Cavia aperea* (preá) poderia ser justificada pelo desenvolvimento de uma infecção inaparente ou ausência de lesões na pele.

Em relação ao seu hospedeiro invertebrado, o único vetor encontrado naturalmente infectado foi *Lutzomyia monticola* (Figura 1). Em um levantamento da fauna flebotomínica (Luz et al., 1967) foram encontradas somente as espécies de *Lutzomyia monticola* e *Lutzomyia correalimai* onde foram observadas cobaias infectadas. A única espécie infectada com *L. enriettii* foi *L. monticola*. Dez espécimes de *L. monticola* foram alimentados em lesões de cobaias infectadas, dessas somente seis desenvolveram formas promastigotas flageladas, porém ao serem inoculados em nova cobaia não houve desenvolvimento da infecção (Luz et al., 1967). Provavelmente, presença da saliva do flebotomíneo permitiria uma maior infectividade do protozoário.

Os estudos envolvendo a espécie *L. enriettii* é rara em artigos científicos, destacando-se a descoberta de duas cobaias supostamente na cidade de Capão Bonito (SP) (Machado et al., 1994) e três *C. porcellus* localizados na cidade de Campina Grande do Sul (PR) (Thomaz et al., 1996). O protozoário *L. enriettii* até o ano de 2011 nunca havia sido encontrado em outro continente além do Americano, caracterizando-se ser uma espécie exclusiva do Novo Mundo. Porém no ano de 2011, pesquisadores a encontraram na Austrália infectando Canguru Vermelho (*Macropus rufus*). A espécie vetora responsável pelo estabelecimento do ciclo foi à espécie *Forcipomyia lasiohelea*, um ceratopogonídeo (Dougall et al., 2011).

Dentro do gênero *Leishmania*, *L. enriettii* é um protozoário que possui um crescimento exuberante das suas formas amastigotas na pele da cobaia (Muniz & Medina, 1948; Machado et al., 1994). A grande maioria dos trabalhos envolvendo esse protozoário aborda o uso desta espécie como modelo para testes de drogas (Belehu & Turk, 1976;

Wong & Chow, 2006; Wong et al., 2007) modelos para infecção de LT (Lobato Paraense, 1953; Bryceson et al., 1970; Schottelius, 1987) e como modelo de inserção de genes (Tobin & Wirths, 1992; Snapp & Landfear, 1999). Entretanto, os estudos sobre a epidemiologia, a infecção em seu hospedeiro vertebrado, susceptibilidade a drogas e glicobiologia são escassos.

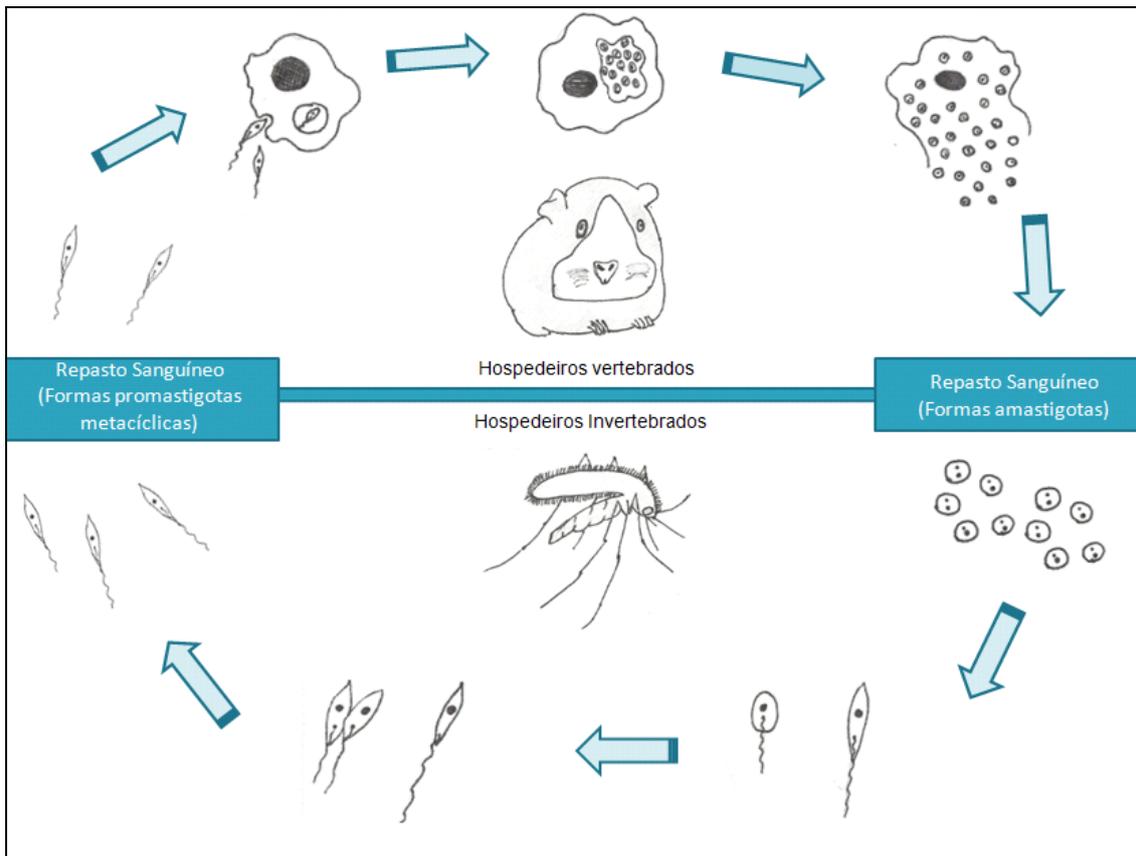


Figura 1. Provável ciclo esquemático da *Leishmania enriettii*. Os flebotomíneos da espécie *Lutzomyia monticola* injetam promastigotas infectantes em seu hospedeiro vertebrado a espécie *Cavia porcellus* durante a alimentação. Promastigotas são fagocitadas e transformam-se nas células dos tecidos em amastigotas, que se multiplicam várias vezes e rompem os macrófagos infectando novas células. Flebotomíneos ao realizarem um repasto sanguíneo em uma cobaia infectada ingerem juntamente com o sangue as amastigotas que se diferenciam no tubo digestivo em promastigotas procíclicas e em seguida sofrem a metaciclo-gênese transformando-se em promastigotas infectantes que podem infectar novos *Cavia porcellus* por meio de uma nova alimentação. Fonte: Larissa Paranaíba e Ana Carolina Gabrich.

1.3. Aspectos da interação *Leishmania*-hospedeiro

Os protozoários classificados dentro do gênero *Leishmania* possuem um ciclo biológico heteroxênico, cujas formas evolutivas alternam-se entre os hospedeiros vertebrados e invertebrados, que transmitem o parasito durante o repasto sanguíneo (Killick-Kendrick, 1979; Sacks & Perkins, 1984). As fêmeas de flebotomíneos infectadas transmitem a *Leishmania* sp através habito alimentar por telmatofagia formando poços de sangue na pele do hospedeiro.

Juntamente com a saliva do flebotomíneo, altamente complexa (Volf et al., 2000), formas promastigotas metacíclicas serão transmitidas ao hospedeiro vertebrado. Estas terão que sobreviver aos mecanismos de defesa do hospedeiro, para que assim, possam ser internalizadas através da fagocitose para o interior dos macrófagos (Assis et al., 2012a; Sacks & Kamhawi, 2001) ou neutrófilos (Peters et al., 2008). Dentro dos macrófagos as promastigotas metacíclicas diferenciam-se em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária, sendo capazes de romper os macrófagos e infectar novas células. Estas podem ser ingeridas num próximo repasto sanguíneo do vetor.

As formas evolutivas do parasito terão que sobreviver às barreiras presentes no inseto vetor tais como enzimas digestivas, matriz peritrófica e a capacidade de aderir rapidamente ao epitélio do intestino antes que os restos da digestão sejam eliminados (Sacks & Kamhawi, 2001). As formas amastigotas se diferenciam em formas promastigotas e posteriormente, elas darão origem a formas promastigotas metacíclicas, que migrarão para porções anteriores do intestino do flebotomíneo de onde serão transmitidas a um hospedeiro vertebrado num próximo repasto.

Para sobreviver à estas condições altamente adversas o protozoário desenvolveu mecanismos importantes incluindo moléculas de superfície.

1.4. Os glicoconjugados de *Leishmania*

Para se desenvolver e estabelecer uma infecção dentro do ambiente hostil encontrado no tubo digestivo do vetor e nos macrófagos do hospedeiro vertebrado, o parasito possui uma grande variedade de moléculas e estratégias. Dentre essas moléculas pode-se destacar os glicoconjugados. O termo “glicoconjugados” refere-se a qualquer molécula que possua algum motivo de carboidrato ligado covalentemente a outra classe de moléculas como lipídeos e proteínas (Turco, 2003).

Moléculas associadas a glicosil-fosfatidilinositol (GPI) são tipicamente consideradas como âncoras lipídicas de outras moléculas de superfície como glicoproteínas e glicolipídeos. Em *Leishmania*, estas estruturas estão presentes como âncoras lipídicas do lipofosfoglicano (LPG), da glicoproteína 63 (gp63) e dos glicoinositol-fosfolípidos (GIPLs) (McConville & Ferguson, 1993).

1.5. Os glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) de *Leishmania*

Os GIPLs estão presentes na superfície celular e revestindo estruturas intracelulares de todas as formas evolutivas de *Leishmania* onde representam o glicoconjugado mais abundante. Apesar dessas características que destacam esse glicolípide, os GIPLs de *Leishmania* são pouco estudados em relação aos LPGs. Apesar de estruturalmente análogos às âncoras GPI, os GIPLs apresentam diversas modificações bioquímicas durante sua síntese, como adição de cadeias laterais e substituições em sua âncora

lipídica (McConville & Ferguson, 1993), por isso representam produtos metabólicos distintos ao invés de simples precursores de âncoras (Zawadzki et al., 1998; Lillico et al., 2003; Assis et al., 2012b).

Estruturalmente, os GIPLs apresentam um grande polimorfismo, entretanto possuem uma estrutura básica conservada de $\text{Man}\alpha 1\text{-4GlcN}$ ligada à porção lipídica, normalmente composta por alquil-acil-glicerol ou liso-alquil-glicerol, por um resíduo de fosfatidilinositol (PI) (McConville et al., 1990 ; Assis et al., 2012a,b). A partir desta estrutura básica, dependendo da espécie ou linhagem analisada, os GIPLs apresentam um intenso polimorfismo relacionado tanto com as substituições dos ácidos graxos na porção lipídica quanto nos açúcares na parte glicídica. Os GIPLs são comumente classificados dentro de três grupos. Os GIPLs do tipo I, em sua maioria apresentam um resíduo de manose como açúcar mais distal é identificado pela substituição do sexto carbono da manose proximal por um resíduo de manose ($\text{Man}\alpha 1\text{-6Man}\alpha 1\text{-4GlcN-PI}$). Os GIPLs do tipo I são a forma predominante em *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica* e *Leishmania aethiopica* (Schneider et al., 1994) e *L. infantum* (Assis et al., 2012b).

Os GIPLs do tipo II possuem como característica a substituição do terceiro carbono da manose proximal por um resíduo de manose ($\text{Man}\alpha 1\text{-3Man}\alpha 1\text{-4GlcN-PI}$). Estes possuem uma composição lipídica mais heterogênea que varia entre combinações de ácido esteárico (C18:0), ácido behênico (C22:0), ácido lignocérico (C24:0) e ácido hexacosanóico (C26:0). Estes GIPLs são comumente encontrados em *Leishmania major*, *Leishmania mexicana* (McConville & Ferguson, 1993), *Leishmania panamensis* e *L. braziliensis* (Assis et al., 2012b). O terceiro grupo, o dos GIPLs híbridos, compartilha características estruturais com os dois primeiros tipos e possuem adição de uma manose no terceiro e sexto carbonos da manose proximal ($\text{Man}\alpha 1\text{-3}(\text{Man}\alpha 1\text{-6})$

Man α 1-4GlcN-PI) encontrados em *L. mexicana* e *L. donovani* (McConville & Ferguson, 1993) (Figura 2). Entretanto, informações acerca dos GIPLs de *L. enriettii* ainda são desconhecidas.

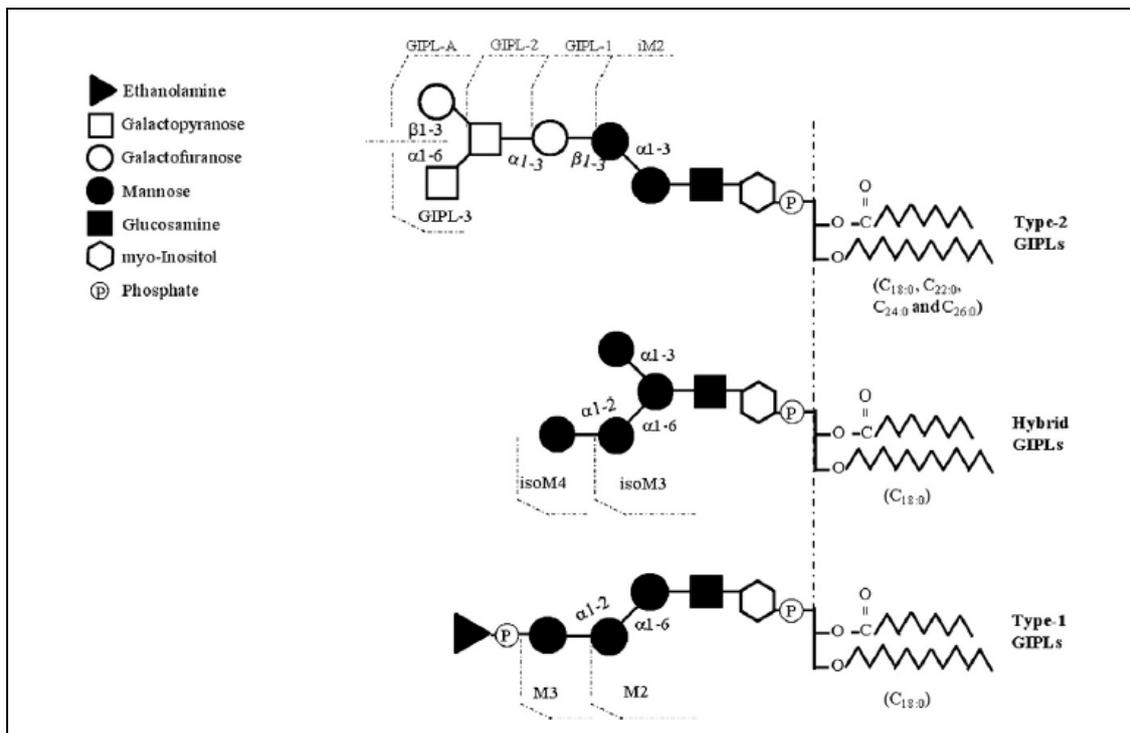


Figura 2. Representação esquemática dos diferentes tipos de glicoinositolfosfolípides (GIPLs). GIPLs *Leishmania* são divididos em três grupos distintos: GIPLs tipo I são caracterizados por uma adição de R-Man α 1 ao sexto carbono do resíduo manose proximal; GIPLs tipo II têm uma substituição do terceiro carbono do manose proximal por uma R-Man α ; GIPLs híbridos compartilham características estruturais com os dois primeiros tipos e possuem adição de R-Man α 1 no terceiro e sexto carbonos da manose proximal. (Extraído de: Assis et al., 2012a)

1.6. Os lipofosfolípidos (LPGs) de *Leishmania*

Ao contrário dos GIPLs, os LPGs são os glicoconjugados de superfície de *Leishmania* mais bem estudados. Estão amplamente expressos nas formas promastigotas onde formam um denso glicocálice que recobre toda a superfície do parasito (Turco & Descoteaux, 1992).

Bioquímicamente, os LPGs possuem uma estrutura geral bem conservada, composta por quatro domínios: (1) uma âncora lipídica conservada representada por 1-O-alkil-2-lisofosfatidilinositol (PI) ligado a; (2) uma porção central composta por um heptassacarídeo também conservado representado por Gal(α 1-6)Gal(α 1-3)Gal_n(α 1-3)[Glc α 1-PO₄]Man(α 1-3)Man(α 1-4)-GlcN(α 1-); (3) uma região de repetições de dissacarídeos fosforilados Gal(α 1-4)Man(α 1-)-PO₄ que podem possuir substituições de um ou mais açúcares dando origem a um grande polimorfismo intra e interespecífico e finalmente, (4), uma região que recebe o nome de cap formada por um oligossacarídeo neutro terminal (Figura 3).

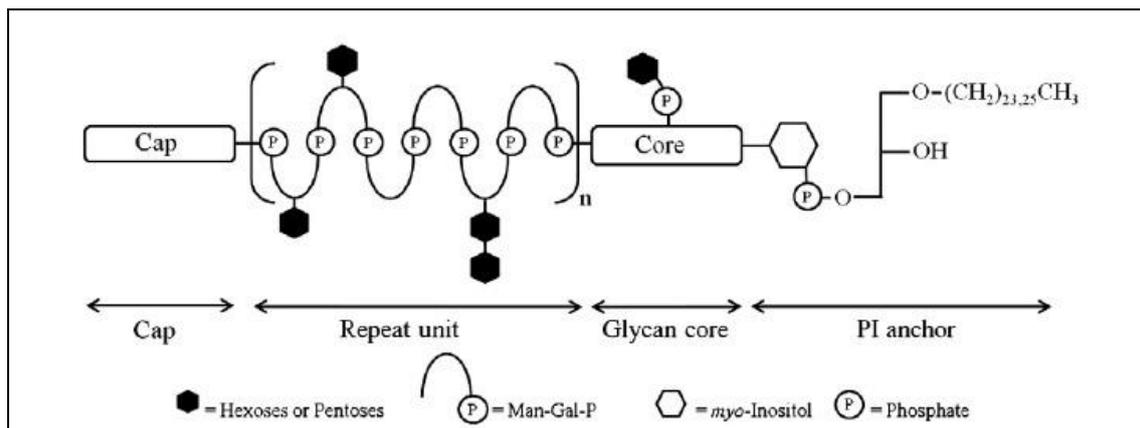


Figura 3. Estrutura bioquímica básica da molécula lipofosfoglicano. LPG tem quatro domínios, uma âncora lipídica de fosfatidilinositol ligada a um alquilglicerol, um núcleo glicano conservado, região de unidades repetitivas e uma chamada de cap. A estrutura e o número de unidades de repetição dos fosfoglicanos variam e dependem do estágio de vida e do tipo de espécie de *Leishmania*. Gal, galactose; Man, manose; Core, Núcleo glicano de hexassacáridos; Cap, oligossacarídeo neutro. (Extraído de: Assis et al., 2012a).

Variações qualitativas e quantitativas nas unidades repetitivas podem ocorrer dependendo da espécie, linhagem e da fase evolutiva do ciclo de vida do parasito. Durante o processo de metaciclo gênese, as unidades repetitivas dobram em número passando de aproximadamente 15 para aproximadamente 30 unidades (McConville et

al., 1992; Sacks et al., 1995; Barron & Turco, 2006). O LPG de promastigotas procíclicas de *L. braziliensis* não possui substituições sendo estruturalmente semelhante ao LPG de *L. donovani* (Sudão) (Sacks et al., 1995). Durante a metaciclogênese em *L. braziliensis* ocorre a adição de mono ou dissacarídeos de β -glicoses no carbono 3 da galactose (Soares et al., 2005).

O LPG de várias linhagens de *L. infantum* já foi descrito e podem ser de três tipos: 1) sem cadeias laterais caracterizando o LPG da maioria das cepas descritas; 2) com uma cadeia lateral de glicose (Soares et al., 2002) e 3) com 3 ou mais cadeias de glicose (Coelho-Finamore et al., 2011). Entretanto a estrutura das unidades repetitivas do LPG de *L. enriettii* ainda é desconhecida.

1.7. Os glicoconjugados de *Leishmania* e a interação com hospedeiros vertebrados

A singularidade da estrutura geral dos glicoconjugados e seus domínios altamente variáveis indicam que os LPGs e GIPLs possuam várias importantes funções no parasita *Leishmania* ao longo de todo seu ciclo de vida, permitindo que esse protozoário sobreviva nos ambientes adversos dentro dos seus hospedeiros vertebrados e invertebrados (Assis et al., 2012a,b). Neste contexto, os glicoconjugados de membrana desempenham um papel fundamental na interação com seus hospedeiros atuando como um fator de virulência multifuncional e são indispensáveis para o estabelecimento de uma infecção bem sucedida (McConville, M. J et al., 1995) (Descoteaux & Turco, 1999) (Assis et al., 2012a,b).

O papel do LPG durante o processo de infecção no hospedeiro vem sendo associado ao reconhecimento, fagocitose por macrófagos e proteção contra o ambiente ácido dos

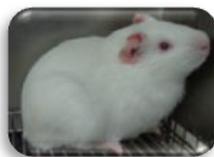
vacúolos parasitóforos (Bogdan & Rollinghoff, 1999) (Wilhelm et al., 2001), resistência ao efeito lítico do sistema do complemento, inibição da maturação fagossomal (Dermine et al., 2000), inibição de proteína quinase C (Piedrafita et al., 1999), capacidade de intervir na integridade dos microdomínios da membrana dos fagossomos (Dermine et al., 2005), modulação da produção de óxido nítrico (NO) e IL-12 (Brittingham & Mosser, 1996; Proudfoot et al., 1996; Ibraim et al., 2013), modulação de MAPKs (Feng et al., 1999; Ibraim et al., 2013), indução de redes extracelulares de neutrófilos (NETs) (Guimaraes-Costa et al., 2009), indução da heme-oxigenase I (Luz et al., 2012), indução da proteína quinase R (PKR) (Carvalho Vivarini et al., 2011), seqüestramento de Ca⁺ (Homans et al., 1992), inibição da expressão do Gene C-Fos (Greenberg & Ziff, 1984) inibição de quimiocinas (Snyderman & Pike, 1984) e capacidade de modular os receptores de TNF- α (Acterberg & Gercken, 1987).

Estudo recente destacou a importância dos GIPLs de *L. braziliensis* e *L. infantum* na modulação do sistema imune tendo um papel inibitório na síntese de NO e IL-12. Esta inibição foi preferencialmente via TLR4. Os dados apresentados defendem a hipótese de que GIPLs de *Leishmania* podem contribuir para a construção de um ambiente mais seguro para o desenvolvimento da infecção por perturbar a polarização de Th1/Th2, por meio da inibição da produção de IL-12 durante os estágios iniciais da infecção e ajudar na sobrevivência do parasito dentro dos macrófagos (Assis et al., 2012b).

Durante os eventos iniciais do compartimento imune inato, os receptores utilizados pela *Leishmania* são TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 (Tuon et al., 2008; Assis et al. 2012a; Faria et al., 2012). A via de sinalização de TLRs consiste em duas cascatas: uma cascata MyD88 e uma cascata TRIF dependente (Kawai & Akira, 2011). Depois do reconhecimento do patógeno, TLRs acionam NF- κ B, o qual em seguida transloca-se para o núcleo da célula e promove a transcrição e síntese de citocinas pró-inflamatórias

(Barton & Medzhitov, 2003) (Ibraim et al., 2013). Macrófagos primados com IFN- γ e expostos a culturas dos protozoários *L. braziliensis* e *L. infantum* e seus respectivos LPGs, demonstraram que a produção de NO em BALB/c e C57BL/6 foi maior quando utilizaram o LPG de *L. braziliensis*. Nestas células, houve participação tanto de TLR2 e TLR4. De modo interessante, ao se utilizar células CHO transfectadas com TLRs, foi observado que o LPG de *L. braziliensis* é um agonista de TLR2, enquanto o LPG de *L. infantum* não ativa este receptor (Ibraim et al., 2013). Em relação à *L. enriettii*, ainda não se sabe qual o papel dos GIPLs e LPGs nestes processos, principalmente quais receptores e vias estão envolvidas.

Tendo em vista o desconhecimento sobre vários aspectos da interação de glicoconjugados de *L. enriettii*, este trabalho teve como objetivo aprofundar em alguns aspectos da glicobiologia desta espécie. Para tanto, foram realizados experimentos *in vivo* e *in vitro* com duas cepas isoladas em dois momentos diferentes (1945 e 1985). Este é o primeiro estudo comparando a glicobiologia de duas cepas de *L. enriettii* bem como aspectos da interação com hospedeiro vertebrado.



JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Leishmania enriettii (Muniz & Medina 1948), tem como hospedeiro vertebrado a espécie *Cavia porcellus* ou cobaias. É uma *Leishmania* pouco conhecida e estudada na área acadêmica. Vários aspectos da biologia da *Leishmania enriettii* encontram-se desconhecidos, tais como glicobiologia, infectividade para macrófagos murinos, perfil de citocinas e padrão da infecção em cobaia.

Várias estruturas bioquímicas de LPGs e GIPLs de espécies de *Leishmania* do Novo e Velho Mundo já foram descritas, porém ainda não há informações sobre *L. enriettii*. Neste projeto, pretendeu-se caracterizar preliminarmente os LPGs e GIPLs de duas cepas de *L. enriettii*. É importante ressaltar que as cepas (MCAV/BR/1945/L88 e MCAV/BR/1985/COBAIA_SP) foram obtidas em dois momentos diferentes no estado do Paraná e São Paulo, respectivamente, uma em 1945 e outra em 1985.

Este projeto fornecerá maiores conhecimentos sobre a interação entre duas cepas de *L. enriettii* e seu único hospedeiro natural já observado e caracterizou pela primeira vez o padrão de desenvolvimento de lesão no focinho das cobaias utilizando formas promastigotas de *L. enriettii* associadas ou não a glândula salivar de flebotomíneos. Além disso, este projeto propiciará um maior conhecimento sobre os glicoconjugados (LPGs e GIPLs) de espécies do Novo Mundo e a descrição do perfil imunológico de NO, citocinas, receptores e fatores de transcrição.



OBJETIVOS

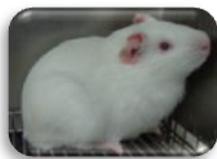
3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Caracterizar preliminarmente os LPGs e GIPLs de duas cepas de *L. enriettii* e avaliar seu papel na interação com macrófagos murinos e células CHO, bem como descrever aspectos da infectividade destas cepas em *Cavia porcellus*.

- **Objetivos específicos**

- Caracterizar o padrão de crescimento das duas cepas de *L. enriettii* (MCAV/BR/1945/L88 e MCAV/BR/1985/COBAIA_SP);
- Caracterizar preliminarmente a estrutura dos LPGs e GIPLs das duas cepas de *L. enriettii*;
- Avaliar a produção de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p40 e TNF- α) e óxido nítrico (NO) por LPGs e GIPLs das duas cepas em macrófagos murinos C57BL/6, TLR2(-/-) e TLR4(-/-);
- Avaliar o padrão de reconhecimento por receptores do tipo TLR2 e TLR4 e produção de NF-kB em células CHO por LPGs e GIPLs das duas cepas de *L. enriettii*;
- Observar o padrão de desenvolvimento da lesão no focinho de *Cavia porcellus* após infecção com as duas cepas de *L. enriettii* na presença ou ausência de extrato de glândula salivar do flebotomíneo (GSF) *L. longipalpis*.



MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cepas de *Leishmania enriettii* e condições de cultivo

As formas promastigotas das cepas de *L. enriettii* (MCAV/BR/1945/L88 e MCAV/BR/1985/COBAIA_SP) de referência da Organização Mundial de Saúde foram isoladas de cobaias (*Cavia porcellus*). Os parasitos foram mantidas em estufa BOD a 25°C em meio definido 199 (Sigma®), acrescido de soro fetal bovino (10%), penicilina (100U/ml), streptomina (50µg/ml), glutamina (12,5mM), Hepes (40mM), adenina (0,1mM) e hemina (0,0005%), pH 7,4 (Soares et al., 2002).

Para conhecer o perfil de crescimento das cepas, os parasitos foram difundidos a partir de uma cultura de células em fase estacionária, em triplicata, em garrafas para cultivo na concentração de 1×10^5 parasitos/mL. O crescimento foi monitorado diariamente por onze dias através da contagem em câmara de Neubauer. Após os dados coletados foi realizado um gráfico de curva de crescimento utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

A cepa de referência MCAV/BR/1945/L88 foi doada pela colaboradora desse projeto a professora Dra. Maria Norma Melo do Laboratório de Leishmanioses da Universidade Federal de Minas Gerais / UFMG e da assistência da Bióloga / Técnica Soraia de Oliveira Silva. A cepa de referência MCAV/BR/1985/COBAIA_SP foi doada da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC) sob supervisão da Dra. Elisa Cupollilo.

4.2. Extração do LPG e GIPLs

Para extrações dos LPGs e GIPLs foram utilizadas culturas em fase estacionária de crescimento. Foi empregado o método descrito por Orlandi & Turco (1987) com modificações (Soares et al., 2002 ; Soares et al., 2005 ; Assis et al., 2012b). Os parasitos foram lavados em PBS 1x e centrifugados (a temperatura ambiente em 2100g por 7 minutos). Para delipidação da amostra foram adicionados ao pellet 2,5ml de solução $\text{ChCl}_3/\text{MeOH}$ (3:2 v/v) e 0,5ml de MgCl_2 a 4mM. O material foi sonicado e centrifugado (a temperatura ambiente em 2100g por 7 minutos) resultando em uma fase sólida intermediária, o sobrenadante foi descartado. Para essa primeira etapa o procedimento foi repetido mais uma vez.

À fase sólida da primeira etapa foram adicionados 2,5mL de MgCl_2 4mM. O material foi sonicado e centrifugado (a temperatura ambiente em 2100g por 7 minutos) para promover a extração de proteínas, o sobrenadante foi descartado. Para essa segunda etapa o procedimento foi repetido mais uma vez. Em seguida foram adicionados ao material da segunda etapa 3,0mL $\text{ChCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (10:10:3 v/v) e 0,5mL de $\text{ChCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1 v/v). O material foi sonicado e centrifugado (a temperatura ambiente em 2100g por 7 minutos) para promover a extração de GIPLs, o sobrenadante não foi descartado. Para essa terceira etapa o procedimento foi repetido mais duas vezes sem adicionar 0,5mL de $\text{ChCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1 v/v) .

Após essa terceira etapa, ao material sólido do procedimento anterior foram adicionados 2,5mL de ESOAK (água/etanol/etil éter/piridina/ NH_4OH ; 15:15:5:1:0,017 v/v). O material foi sonicado e centrifugado (a temperatura ambiente em 2100g por 7 minutos) para promover a extração de LPGs, o sobrenadante não foi descartado. Para essa quarta etapa o procedimento foi repetido mais três vezes.

Os extratos foram evaporados em nitrogênio a 45°C e o LPGs e GIPLs foram purificados em coluna de fenil-sefarose como descrito previamente (Soares et al., 2002; Soares et al., 2005; Assis et al., 2012b; Ibraim et al., 2013) (Figura 4).

As metodologias aplicadas e o desenvolvimento dos procedimentos laboratoriais contam com a colaboração da aluna de iniciação científica Ana Carolina Souza Gabrich que cursa Biomedicina na Fundação Mineira de Educação e Cultura / FUMEC.

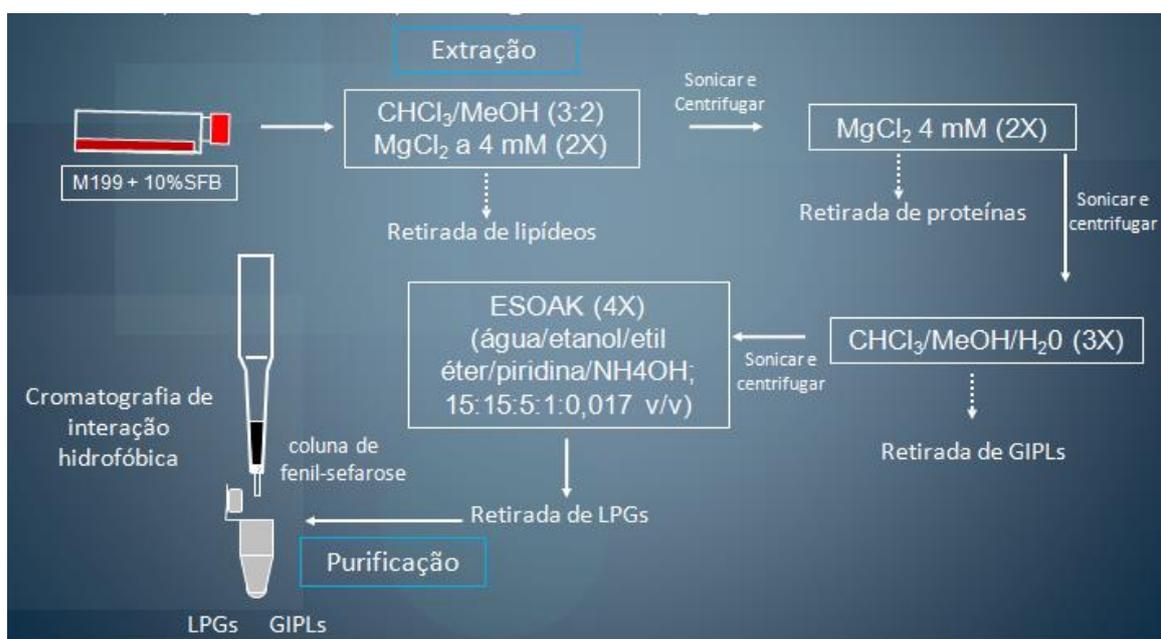


Figura 4. Esquema da representação da extração e purificação dos LPGs e GIPLs das duas cepas de *L. enriettii*. A extração foi realizada com o uso de vários solventes orgânicos, cuja penúltima etapa extraíram os GIPLs e na última foi extraído os LPGs. Após as extrações as amostras dos dois glicoconjugados foram purificados em uma coluna de Fenil-Sefarose pela técnica da cromatografia de interação hidrofóbica.

4.3. Purificação dos LPGs e GIPLs

A amostra contendo LPGs e GIPLs foram solubilizadas em 1mL da solução ácido acético 0,1M/cloreto de sódio 0,1M, sonicadas e submetidas a uma cromatografia de interação hidrofóbica usando a resina Fenil-Sefarose. Aproximadamente 1mL de Fenil-Sefarose foi aplicado em uma coluna Bio-Rad (#731-1550). A coluna foi lavada seis vezes com o volume de acético 0,1M/cloreto de sódio 0,1M utilizado, o qual

possibilitou o empacotamento da resina (Soares et al., 2002; Soares et al., 2005; Assis et al., 2012b; Ibraim et al., 2013).

Após o empacotamento as amostras contendo LPGs ou GIPLs foram adicionadas. Em seguida, o material foi lavado de acordo com a seguinte seqüência: 1mL de acético 0,1M/cloreto de sódio 0,1M, 1mL de ácido acético 0,1M, 1mL de dH₂O e 4mL de ESOAK (água/etanol/etil éter/piridina/NH₄OH; 15:15:5:1:0,017 v/v) utilizados para eluir o LPGs e GIPLs. No final dessas etapas, as amostras foram evaporadas em nitrogênio, em seguida, solubilizadas em 100µL de água milli-Q e armazenadas a 4°C (Soares et al., 2002; Soares et al., 2005; Assis et al., 2012b; Ibraim et al., 2013). Os LPGs ou GIPLs foram dosados pelo método fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956)(Figura 4).

As metodologias aplicadas e o desenvolvimento dos procedimentos laboratoriais contaram com a colaboração da aluna de iniciação científica Ana Carolina Souza Gabrich que cursa Biomedicina na Fundação Mineira de Educação e Cultura / FUMEC.

4.4. Dosagem do LPGs e GIPLs

Os LPGs e GIPLs foram dosados pelo método fenol-ácido sulfúrico. Uma alíquota de 10µL de cada LPG e GIPL purificado foi diluída em 250µL de água tipo 1. Às amostras foram adicionados 750µL de ácido sulfúrico, ficando em repouso por 2min no gelo. Após essa etapa aplicou-se sobre as amostras 13µL de fenol puro. Em seguida, as amostras foram agitadas em vórtex e passados 30 minutos, a absorbância das amostras foram avaliadas em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 490nm.

A curva padrão foi preparada utilizando uma solução equimolar de galactose e manose (2mg/mL), de modo que os pontos corresponderem às seguintes concentrações: 50µg/mL, 100µg/mL, 150µg/mL e 200µg/mL (Dubois et al., 1956).

4.5. Análise da purificação do LPG usando a técnica de *Western-blot*

Para confirmar a presença dos LPGs das duas cepas de *L. enriettii* nos materiais purificados, os LPGs foram submetidos a um *Western-Blot* utilizando anticorpos específicos anti-LPG: CA7AE (1:1000) que reconhece as unidades repetitivas presentes em todos os LPGs (Soares et al., 2002; 2005) (Tabela 1).

Tabela 1. Soluções para o preparo dos géis de resolução e concentração (poliacrilamida 12%)*:

Reagentes	Gel de resolução	Gel de concentração
Acrilamida de 30% bis 0,8%	3ml	0,65ml
Tris-HCl (1,5 µl pH=8,8)	1,8ml	-----
1,25 ml de Tris-HCl	-----	1,25ml
H ₂ O	2,6ml	3,05ml
APS 10%	100µl	100µl
TEMED	10µl	5µl

*Volume suficiente para um mini-gel de 0,75mmx14x14.

A amostra foi submetida à eletroforese com diferença de potencial constante de 120V. Em seguida, o material foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (45µm) sob uma corrente de 42 mA por 1 hora utilizando o aparelho de transferência Semi-Dry Bio-Rad Trans-Blot[®]SD semi dry transfer cell (Figura 5).

A membrana foi bloqueada por 1 hora em uma solução de caseína 5% e posteriormente foi incubada com o anticorpo primário CA7AE (1:1000) por mais uma hora. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-1x em intervalos de 5 minutos entre cada lavagem e incubada por 1 hora com o anticorpo secundário Anti-IgG de rato conjugado com peroxidase (1:10000).

Após uma nova etapa da lavagem da membrana, a essa foi aplicado 1mL de solução SuperSignal[®] Pico West (solução de peróxido estável) e 1mL de solução SuperSignal[®] Pico West (solução potenciadora) (Soares et al., 2005), a visualização da membrana foi

possível com o uso do aparelho Image quant – Luminecent / Image Analyzer LAS 4000[®].

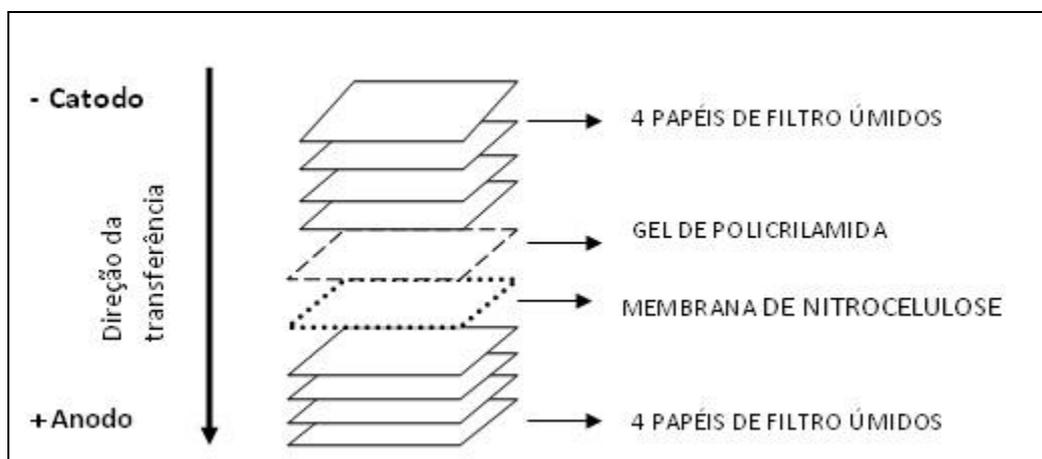


Figura 5. Esquema da representação da montagem do gel no aparelho de transferência (Semi-Dry Bio-Rad Trans-Blot[®]SD semi dry transfer cell). A montagem é constituída por quatro papeis de filtro úmidos, um gel de poliacrilamida, uma membrana de nitrocelulose e quatro papeis de filtro úmidos.

4.6. Caracterização preliminar das unidades repetitivas das formas procíclicas de *Leishmania enriettii*

Os LPGs purificados das duas cepas de *L. enriettii* foram parcialmente despolimerizados após hidrólise ácida branda. Para a realização do experimento da hidrólise ácida branda, os LPGs purificados foram submetidas a um spin de 5 segundos, foi adicionado HCl a 0,02M na mesma quantidade existente da amostras e acondicionou-a em banho-maria a 100°C por 5 min.

Após a hidrólise ácida branda as amostras foram submetidas à partição butanol: água (1:2). Para a realização da partição butanol: água adicionou-se 600µL de uma solução saturada de butanol/água (2:1). Homogeneizou-se a amostra no vórtex e centrifugou-se a 14.000rpm por 6-8 minutos. A fase superior (butanólica) contendo a porção central e a âncora lipídica do LPG foi desprezada.

Adicionou-se 600µL de solução saturada de butanol/água (2:1) à fase aquosa que continha as unidades repetitivas e o cap dos LPGs. A fase aquosa foi removida e submetida à evaporação em centrifuga evaporadora (Speed-Vac) (Soares et al., 2002).

As unidades repetitivas foram tratadas com fosfatase alcalina para remoção dos grupos fosfato (Mahoney et al., 1999). As unidades repetitivas dos LPGs foram visualizadas através de eletroforese de carboidratos (Figura 6) (Soares et al., 2004). Os monossacarídeos resultantes dos GIPLs foram analisados por eletroforese de monossacarídeos, técnica padronizada e estabelecida por (Soares et al., 2004).

As metodologias aplicadas e o desenvolvimento dos procedimentos laboratoriais contaram com a colaboração da aluna de doutorado do programa de Parasitologia / UFMG Paula Monalisa Nogueira.

4.7. Eletroforese de carboidratos – FACE (*Fluorophore-assisted carbohydrate electroforesis*)

Após a obtenção de unidades repetitivas, fez-se necessário a derivatização destes carboidratos para dar carga a eles e torna-los fluorescentes. Neste processo as amostras foram marcadas com 1µL de solução de AMAC (0,05M em 15% de ácido acético) e 1µL de cianoborohidreto de sódio em THF (1M) (tetraidrofurano).

As amostras foram solubilizadas no vórtex, após um spin de 5 segundos, incubadas por 16 horas em banho-maria a 37°C. Após a incubação, foram adicionados às amostras 2µL de tampão de amostra 2X (“thorin” a 0,01% em 20% de glicerol) (Figura 6). As condições de gel e da eletroforese foram realizadas de acordo com (Soares et al., 2004) sob corrente elétrica constante de 20mA. O gel foi visualizado sob luz UV. As amostras foram aplicadas em um gel conforme a Tabela 2:

Tabela 2. Condições técnicas da eletroforese*

Reagentes	Gel de resolução	Gel de concentração
Solução de gel de resolução 38% (p/v) de acrilamida e 2% N,N' metilenebisacrilamida)	6,0mL	-----
8x tampão de resolução (1,5 M Tris-HCl, pH 8.9)	1,0mL	-----
TEMED (N,N,N,N-etrametiletilenodiamina)	0,01mL	0,005mL
8x tampão de concentração (1M Tris-HCl, pH 6.8)	-----	0,5mL
Solução de gel de concentração (1,92M glicina, 0,25M Tris-base, pH 8,3)	-----	2,0mL
H ₂ O destilada	1,0mL	1,5mL
10% de persulfato de amônio (APS)	0,03 mL	0,02 mL

*Volume suficiente para um mini-gel.

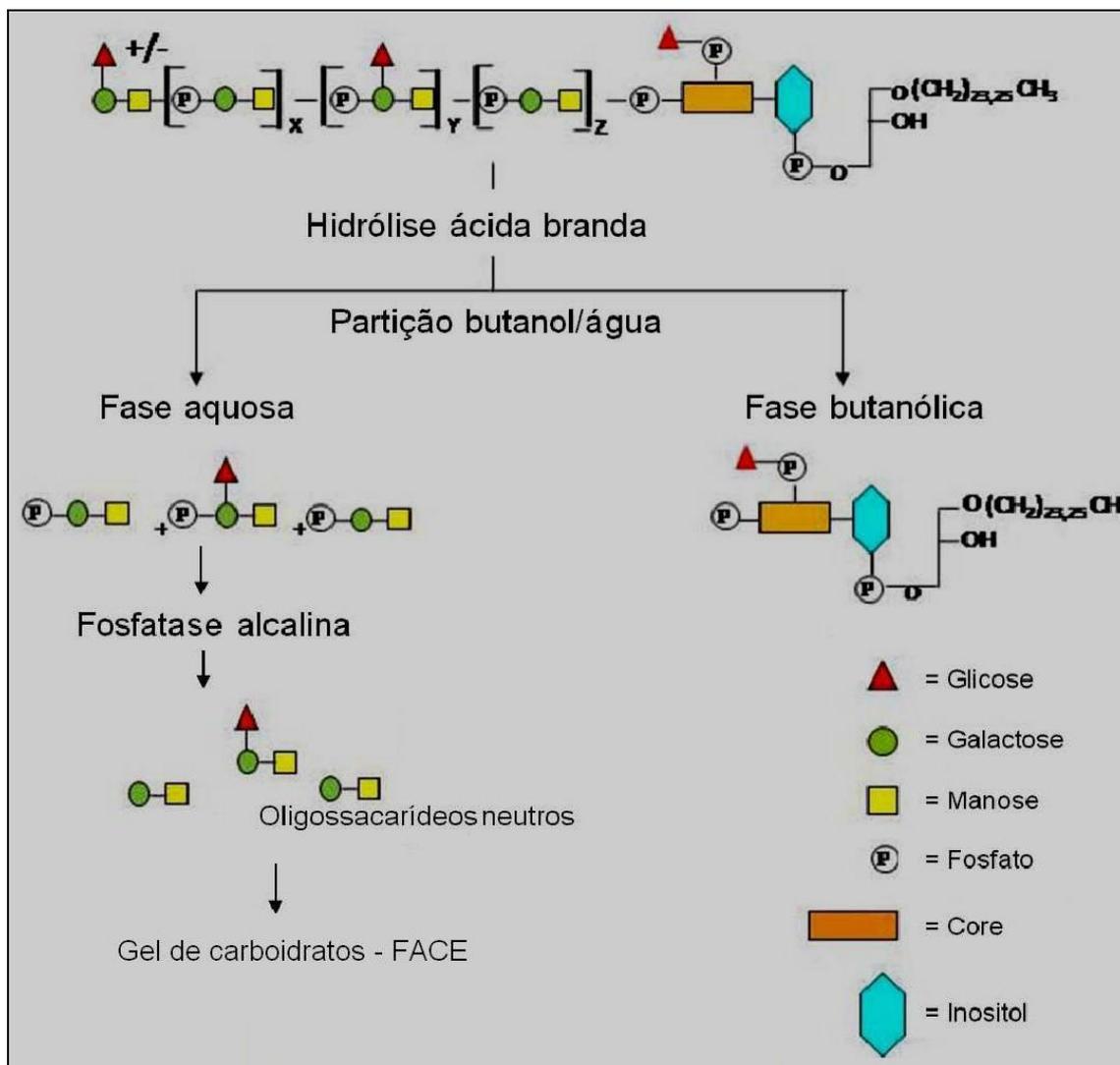


Figura 6. Esquema de fracionamento do LPG. A hidrólise ácida branda (HCl 0,02N, 5 min, 100°C) fragmenta o LPG e libera glicanos fosforilados e a porção central-âncora lipídica. Estas últimas são separadas dos demais componentes após partição butanol : água (2:1). As unidades repetitivas fosforiladas foram então tratadas com fosfatase alcalina para retirada dos grupos fosfato. Os perfis foram posteriormente visualizados por meio de Eletroforese de carboidratos (adaptado de Mahoney et al., 1999).

4.8. Eletroforese de monossacarídeos – FACE (*fluorophore-assisted carbohydrate electroforesis*)

Os GIPLs foram submetidos à hidrólise ácida forte (ácido trifluoroacético 2N, 100°C, 3 horas) para fragmentação em monossacarídeos. Os oligossacarídeos neutros da amostra dos GIPLs foi solubilizada em 150µL de tampão 15 mM de Tris-HCl com pH 9,0 ao

qual foi adicionado 1 μ L de fosfatase alcalina (2 U). Em seguida, a amostra foi incubada no banho-maria a 37°C por 16 horas para clivagem dos grupos fosfato.

Para dessanilização das amostras, as mesmas foram submetidas à cromatografia de troca iônica. Em uma coluna Bio-Rad (#731-1550) foram adicionados 2mL da resina AG50W-X12 de modo que o volume final após o empacotamento com metanol/água (1:1) fosse de 0,6mL. Em seguida foram adicionados 2mL da resina AG1-X8 submetida ao mesmo procedimento. A amostra foi aplicada a essa coluna e o processo permitiu a eluição das unidades repetitivas neutras em 5mL de água mili-Q.

O restante do material foi evaporado em centrífuga evaporadora e uma alíquota foi submetida à hidrólise ácida forte com ácido trifluoroacético (TFA 2N, 100°C, 3 h). Aos monossacarídeos neutros, obtidos através de hidrólise ácida forte, foram adicionados 2 μ L de AMAC (0,05M em 15% de ácido acético) e 2 μ L de cianoborohidreto de sódio em THF (1M). As amostras foram incubadas por 18 horas no banho-maria a 37°C ou 3 horas a 40°C (Assis et al., 2012b).

Os géis de resolução e concentração foram feitos de acordo com (Coelho-Finamore et al., 2011). O gel foi submetido à eletroforese e visualizado sob luz UV. Para o padrão foram utilizados os açúcares D-glicose, D-galactose e D-manose (500 μ g/mL) (Figura 7). As amostras foram aplicadas em um gel conforme a Tabela 3:

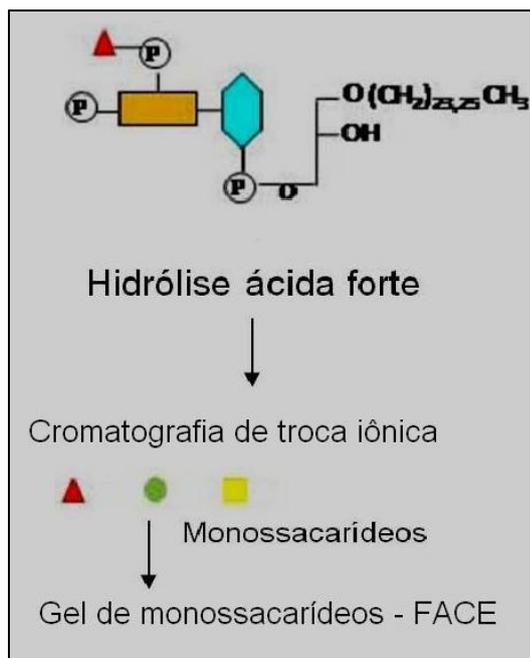


Figura 7. Esquema de fragmentação do GIPL. As unidades repetitivas foram submetidas à hidrólise ácida forte (ácido trifluoroacético 2N, 100°C, 3 horas) para fragmentação em monossacarídeos. Esses foram analisados pela Eletroforese de monossacarídeo (adaptado de Mahoney et al., 1999).

Tabela 3 Condições técnicas da eletroforese*

Reagentes	Gel de resolução	Reagentes	Gel de concentração
Solução de gel de resolução (10% acrilamida, 2% N,N' metilenebisacrilamida)	4,0mL	Solução de gel de concentração (10% acrilamida, 2,5% ,N' metilenebisacrilamida)	2,0mL
Tampão de resolução 4x (0,75 M Tris-HCl, 0,5 ácido bórico, pH 7.0)	2,0mL	Tampão de concentração 4x (0,5µM Tris-HCl, 0,5 ácido bórico, pH 6.8)	1,0mL
TEMED (N,N,N,N-Tetrametiletilenodiamina)	0,01mL	TEMED (N,N,N,N-Tetrametiletilenodiamina)	0,01mL
H ₂ O destilada	2,0mL	H ₂ O tipo 1	1,0mL
10% de persulfato de amônio (APS)	0,03mL	10% de persulfato de amônio (APS)	0,015mL

*Volume suficiente para um mini-gel.

4.9. Produção de NO e citocinas em macrófagos murinos

Os animais foram adquiridos e criados conforme as Normas Internacionais de Criação e Uso de Animais de Laboratório (*Guide for the Care and Use of Experimental Animals*, 1996) em acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA / Fiocruz (protocolo P-82/11-4). O protocolo de manuseio para os camundongos “*knockout*” foi aprovado pela comissão Nacional de Biosegurança (CTNBio) (protocolo #01200.006193/2001-16).

Os macrófagos peritoneais de camundongos foram estimulados com LPGs e GIPLs das duas cepas de *L. enriettii*. Para avaliar uma possível participação dos receptores TLR2 e TLR4 foram utilizados camundongos fêmeas de seis semanas C57BL/6 selvagens knock-out (TLR2 (-/-) e TLR4 (-/-)). Foram injetados 2mL de tioglicolato de sódio (3%) via intraperitoneal. Após 72 horas os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂, mergulhados em álcool 70% para desinfecção e imobilizados na posição decúbito dorsal.

Após a exposição da cavidade peritoneal, os macrófagos foram coletados com uma seringa contendo 5mL de Meio RPMI 1640 não suplementado (Sigma®). As células foram contadas em câmara de Neubauer, ressuspendidas e aplicadas em placa de 96 poços na concentração de $3,5 \times 10^5$ células/poço. A placa foi incubada por 1 hora à 37 °C em 5% de CO₂ para adesão das células. Em seguida, às placas foram acrescentadas IFN- γ (3U/mL). A placa foi novamente incubada à 37°C em 5% de CO₂ por um período de 24 horas. Conforme trabalhos anteriores do nosso grupo (Assis et al, 2012b, Ibraim, et al., 2013) a concentração escolhida de LPGs e GIPLs utilizada foi 10 μ g/mL. Aos poços destinados à interação, foi adicionado meio RPMI 1680 (Sigma®) suplementado (10% SFB) contendo os parasitos vivos das duas cepas estudadas, seus respectivos LPGs e

GIPLs (10µg/mL) e o LPG de *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/2903) (10µg/mL) como controle positivo. O controle negativo foi representado pelo sobrenadante de macrófagos pré-incubados com IFN- γ e meio de cultura (RPMI 1680 (Sigma[®])). Cada amostra foi preparada em duplicata em duas placas diferentes. A placa foi incubada à 37°C em 5% de CO₂ por um período de 48 horas. Após este período de incubação, os sobrenadantes foram coletados e congelados à -80°C para posterior determinação dos níveis nítrito.

A concentração de nítrito no meio de cultura foi determinada através da reação de Greiss (Greiss Reagent System, 2009). As placas foram lidas a 540nm, e as concentrações de NO₂ foram determinadas de acordo com uma curva padrão, usando nítrito de sódio em meio de cultura. Os mesmos sobrenadantes foram submetidos à citometria de fluxo para dosagem de citocinas.

A concentração de citocinas (TNF- α , IL-10, IL-1 β , IL-6, e IL-12p40) nos sobrenadantes foi determinada usando o Kit CBA (BD[®] Biosciences, CA) de acordo com as recomendações do fabricante. A aquisição dos dados foi realizada no citômetro *FACS Calibur* (Beckton Dickinson, Mountain View, CA, EUA). A análise dos dados foi realizada utilizando o programa *FlowJo software 7.6.4* (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA) para 2400 eventos (mínimo de 480 eventos por bead). Após os dados coletados foi realizada análise estatística e construção de gráficos utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

Os ensaios de dosagem de citocinas e NO contaram com o suporte da Plataforma de Citometria de Fluxo do Centro de Pesquisas René Rachou /CPQRR com a colaboração da Dra. Ana Cláudia Torrecilhas da Universidade Federal de São Paulo / UNIFESP e das alunas de doutorado Amanda Silveira e Paula Nogueira.

4.10. Translocação de NF- κ B

As linhagens celulares de CHO com gene repórter CD25, do tipo TLR2(-/-) TLR4(-/-), TLR2 (-/-) e TLR4 (-/-) (Lien et al., 1999) foram mantidas aderidas como monocamadas em Ham's F-12/DMEM suplementado com 5% de SFB, a 37°C, 5% de CO₂ e antibióticos. Todas as linhagens celulares foram derivadas a partir de um clone 3E10, que foi transfectada estavelmente em presença do gene repórter CD25, sob o controle do promotor da E-selectina humano. Este promotor contém um sítio de ligação de NF- κ B; a expressão na superfície de CD25 é completamente dependente da translocação de NF- κ B para o núcleo da célula (Delude et al., 1998).

Culturas de sete dias de células CHO foram colhidas de uma garrafa de cultura com tripsina-EDTA e DMEM +F12. Aproximadamente 100 μ L (2 gotas da solução de células) foram plaqueadas em cada 24 poços a uma densidade de 1×10^5 células/poço, mantidas por 24h para adesão á 36 °C em estufa. Após esse período, as moléculas ou bactérias (*Staphylococcus aureus* [1000] bactérias/poço, o controle positivo de TLR2), o controle positivo de TLR4 LPS (200ng/poço) e as amostras LPG e GIPL (0,2 μ g ou 0.02 μ g/poço) de duas cepas de *L. enriettii* e *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/2903) foram aplicadas em cada poço por 18 h.

As células foram soltas com tripsina-EDTA, lavadas em meio PBS-1x. Subseqüentemente, as células foram contadas e coradas com PE conjugado com anti-CD25 (anticorpo para humano CD25, conjugado com R-PE; Caltag Laboratories, Burlingame, CA) a 1:200 em PBS-1x, em gelo, no escuro, durante 30 min. Após a marcação, as células foram lavadas duas vezes com o mesmo tampão, novamente suspensas em azida de sódio 1mM em PBS, e analisadas por citometria de fluxo no aparelho FACsCAM (BD Biosciences, San Jose, CA) conforme trabalhos anteriores

(Lien, E et al., 1999; Ibraim et al., 2013). As análises foram realizadas usando o programa *Cell-QuestTM software package* fornecido pelo fabricante (BD Biosciences).

Os ensaios com as células CHO contaram com o suporte da Plataforma de Citometria de Fluxo do Centro de Pesquisas René Rachou / CPQRR com a colaboração do Dr. Marco Antônio Silva Campos e da aluna de iniciação científica Natalia Lima Pessoa do Laboratório de Imunopatologia/CPQRR.

4.11. Experimento *in vivo* em cobaias

Estudos anteriores mostraram que pequenas quantidades de saliva de flebotomíneos poderiam aumentar a infecção quando co-inoculadas com promastigotas de *Leishmania* spp. (Titus & Ribeiro, 1988 ; Belkaid et al., 1998 ; Laurenti et al., 2009a). Propondo um modelo mais próximo do que ocorre na natureza foi realizado um estudo de infecção usando cobaias infectadas com a cepa L88 (grupo 1, animais nomeados de 1 a 5), cepa L88 + GSF [Glândula Salivar de Flebotomíneo] (grupo 2, animais nomeados de 6 a 10), cepa Cobaia (grupo 3, animais nomeados de 11 a 15) e cepa Cobaia + GSF (grupo 4, animais nomeados de 16 a 20).

O modelo animal escolhido foi *Cavia porcellus* machos jovens, que foram criados conforme as Normas Internacionais de Criação e Uso de Animais de Laboratório (*Guide for the Care and Use of Experimental Animals*, 1996) em acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA / Fiocruz com licença p-0237-06 obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) – Fiocruz / Rio de Janeiro.

Os animais foram mantidos em gaiolas com cinco animais, livre acesso á água e comida, numa sala com temperatura controlada, em torno de 24°C, e ciclo claro/escuro natural (12 horas de claridade a partir das 7:00 h) no Biotério de Experimentação do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ.

As glândulas salivares de flebotomíneos fêmeas da espécie *L. longipalpis* foram extraídas com 4-6 de dias de idade da colônia pertencente ao Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia / UFMG com uso de duas pinças. Dez glândulas salivares foram dissecadas e colocadas em 20µL de PBS-1x e armazenadas a -80°C, para cada experimento. Imediatamente antes da utilização, as glândulas foram sonicadas em banho por 10 segundos (Belkaid et al., 1998).

Para inoculação intradérmica foram usadas 1×10^6 promastigotas de *L. enriettii* de cada cepa que foram centrifugadas em 3000rpm, por 10 minutos. A inoculação foi intradérmica no fucinho utilizando uma seringa de insulina de 1mL em um volume de 100µL de PBS-1x contendo as formas promastigotas 1×10^6 (Belkaid et al., 1998) associadas ou não a dois ácinos de glândula salivar por animal.

O curso da infecção foi avaliado semanalmente (7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84 e 91 dias) através da pesagem dos animais, monitoramento clínico utilizando os parâmetros avaliados através da escala analógica unipolar variando de 0 a 4 pontos (cianose, lacrimação, trem posterior, irritabilidade, piloereção, contorção, ptoses palpebral, frêmito vocal, hipotermia, tremores, convulsões e ataxia) ou bipolares variando de 0 a 8 pontos, sendo 4 o valor representante da normalidade (atividade geral, respiração, reflexo auricular, estimulações, reflexo corneal, endireitamento, tônus corporal, e força de agarrar) e óbito (sim ou não) (Brito, 1994).

As lesões foram demarcadas com caneta esferográfica preta no fucinho da cobaia e sua impressão foi realizada sobre uma folha de papel filtro com auxílio de álcool. As distâncias entre as extremidades das lesões foram medidas com auxílio de uma régua, posteriormente feito os cálculos dessas áreas. Os animais foram acompanhados por 91

dias após a inoculação. Foram necessários 40 animais, 20 por experimento divididos em 4 grupos (Figura 8)

A extração das glândulas salivares dos flebomíneos foi realizada no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais / UFMG com ajuda do doutorando do programa de Parasitologia / UFMG Antonio F. Mendes e os ensaios de interação *in vivo* foram realizados no Laboratório de Biomarcadores de Diagnósticos Moleculares (LBDM) / FIOCRUZ com apoio da Tecnologista / Medica Veterinária Patrícia Martins Parreiras.

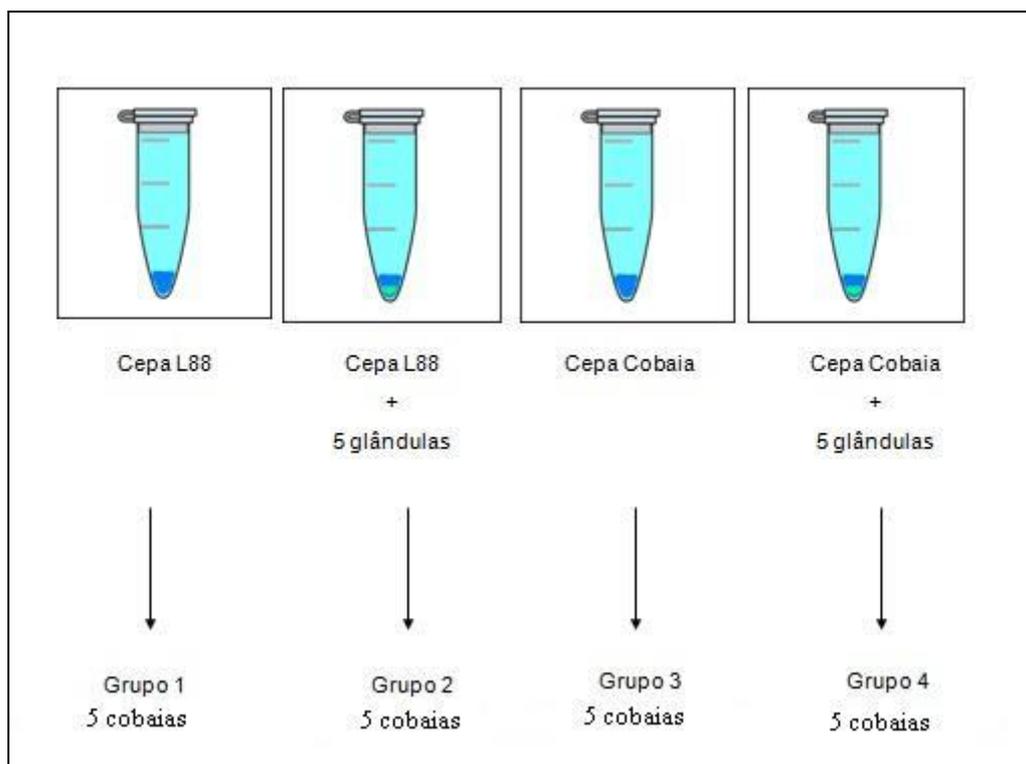


Figura 8. Representação esquemática dos tubos eppendorfs utilizados para a infecção e divisão dos grupos dos animais infectados no experimento de infecção *in vivo*. Foram realizados dois experimentos consecutivos totalizando 40 animais, cujos grupos são: grupo 1 (5 animais infectados com a cepa L88), grupo 2 (5 animais infectados com a cepa L88 +GSF), grupo 3 (5 animais infectados com a cepa Cobaia) e grupo 4 (5 animais infectados com a cepa Cobaia +GSF).

4.12. Análise estatística

Os dados obtidos após a estimulação dos macrófagos com as diferentes cepas de *L. enriettii* e seus respectivos LPGs e GIPLs bem como a medida da espessura das lesões foram representadas através da média \pm desvio-padrão. O teste Shapiro-Wilk foi realizado para avaliar a hipótese nula de distribuição Gaussiana dos dados (considerando $P > 0,05$) (SHAPIRO, 1965). Os testes T student e ANOVA foram realizados para comparação das médias entre amostras independentes e entre os grupos, respectivamente. Os dados foram analisados e os gráficos foram construídos utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 e valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.



RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Curva de crescimento

Para conhecer o perfil de divisão das cepas e obter um número máximo de parasitos viáveis para os experimentos foi realizada uma curva de crescimento. As cepas apresentaram um padrão de crescimento similar, alcançando a fase estacionária após o 10º dia. A cepa Cobaia alcançou densidade máxima de $8,7 \times 10^6$ parasitos/mL, enquanto que para a cepa L88, este número foi de $6,5 \times 10^6$ parasitos/mL. Por esta razão, foi escolhido o dia 10 de crescimento para extração do LPG de ambas as cepas (Figura 9).

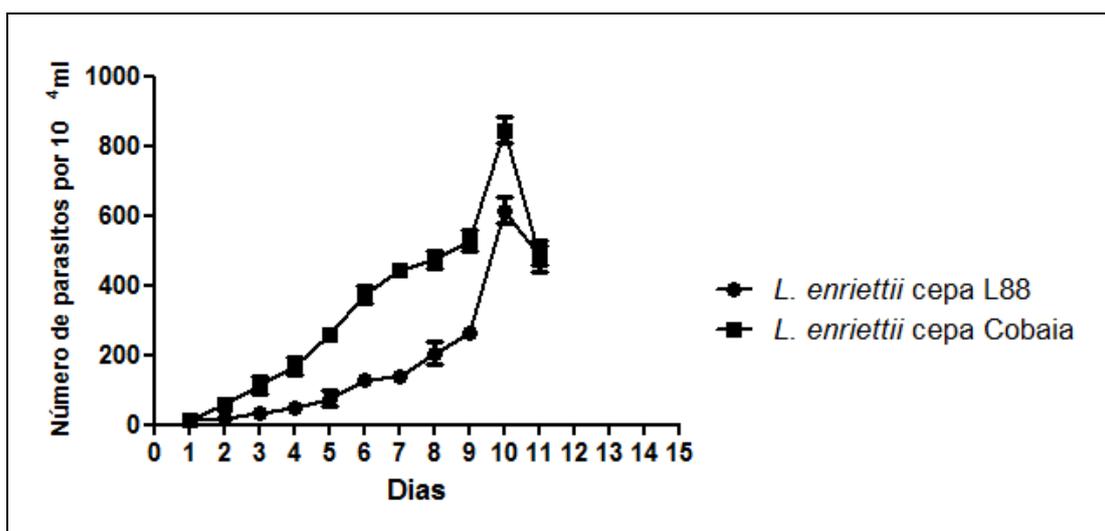


Figura 9. Curvas de crescimento tempo dependente das formas promastigotas de cepas de *L. enriettii* (cepa Cobaia e L88) em meio M199.

5.2. Purificação do LPG

Os LPGs purificados das cepas de *L. enriettii* foram reconhecidos pelo anticorpo CA7AE evidenciando um arraste característico devido aos carboidratos. O LPG da cepa L88 apresentou um arraste superior ao da cepa Cobaia, sugerindo que o LPG da cepa L88 possuiu uma cadeia com maior número de unidades repetitivas. Conforme

esperado, o controle positivo (LPG da cepa BH46 de *L. infantum*) foi reconhecido pelo anticorpo (Figura 10).

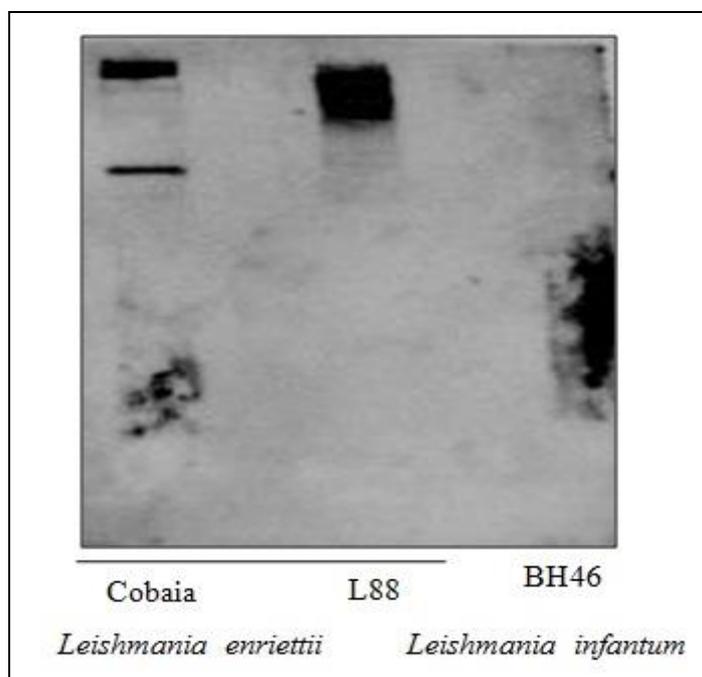


Figura 10. Western-blot de LPG purificado (10 μ g) de *L. enriettii* (cepas Cobaia e L88) e *L. infantum* (BH46) em presença do anticorpo CA7AE (1:1000).A purificação pode ser observado no gel de poliagrilamida através dos arrastes presentes tanto no controle quanto nas duas cepas de *L. enriettii*. O LPG da cepa L88 apresenta um arraste com maior peso molecular comparado com o peso do LPG da cepa Cobaia.

5.3. Análise do perfil das unidades repetitivas dos LPGs

Todos os LPGs foram hidrolisados para obtenção de suas unidades repetitivas. Essas unidades foram marcadas e submetidas à eletroforese para visualização dos perfis de carboidratos. Para a identificação do número de açúcares foi utilizado um padrão de peso molecular de oligoglicoses (G1-G7) cujas bandas indicam o perfil de migração de mono a heptassacarídeo (Fig. 10).

De acordo com nosso marcador, ambas as cepas apresentaram uma banda na posição G2, resultado esperado uma vez que todos os LPGs possuem os dissacarídeos Gal-Man na região das unidades repetitivas (Figura 10). Desta forma, foram identificados

somente unidades repetitivas sem cadeias laterais que migraram na posição correspondente a um dissacarídeo (G2).

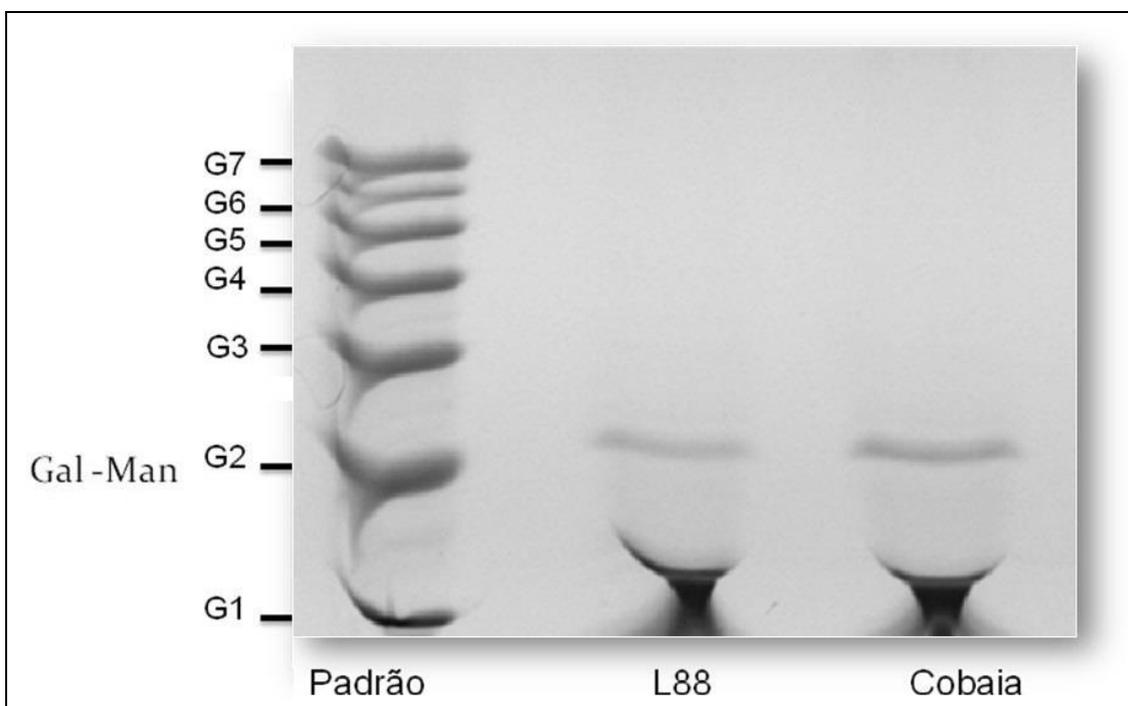


Figura 11. Perfil das unidades repetitivas do LPG das cepas de *L. enriettii* (L88 e Cobaia) visualizados sob luz UV. As cepa L88 e Cobaia possuem somente dissacarídeo na sua unidade repetitiva. Gal = galactose; Man = manose.

5.4. Identificação de monossacarídeos dos GIPLs

Para determinar quais monossacarídeos compõem os GIPLs, os oligossacarídeos neutros foram submetidos à hidrólise ácida forte (Figura 11). Ao contrário do que foi observado no gel de polissacarídeos (Figura 10), ocorreu um polimorfismo na composição dos GIPLs.

Conforme esperado, manose e galactose estão presentes nas duas cepas de *L. enriettii*. A cepa L88 caracteriza-se por ser rica nos monossacarídeos galactose e manose, sugerindo similaridade com o GIPL do tipo II. Já a estrutura do GIPLs da cepa Cobaia apresenta em sua composição os açúcares manose e glicose. Vale ressaltar que este GIPL é rico em glicose, uma característica nunca observada para GIPLs de *Leishmania* (Figura 11).

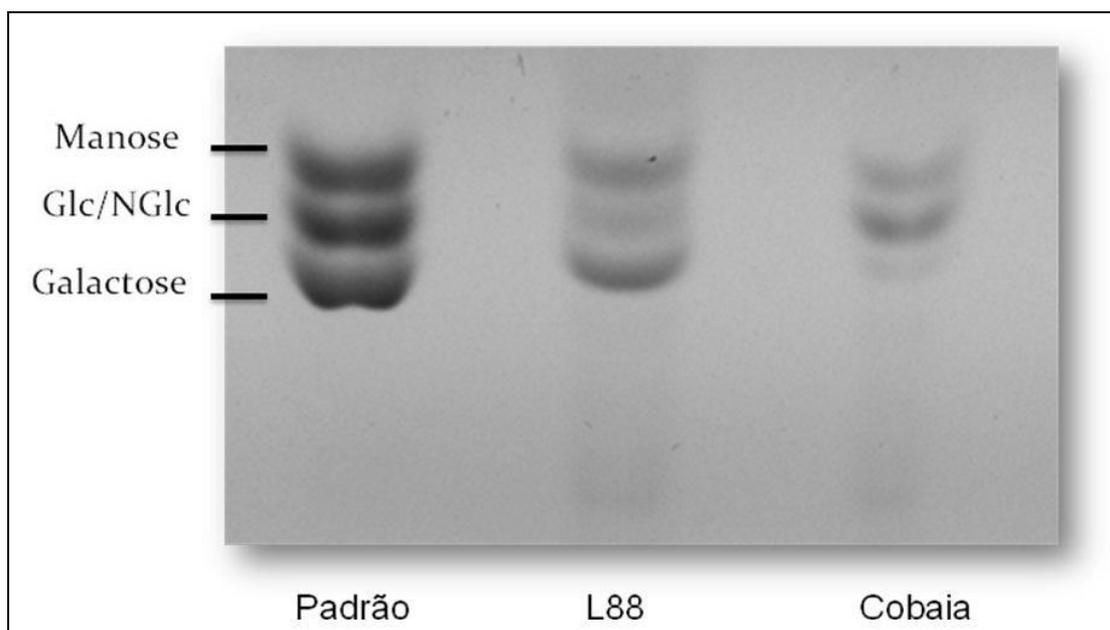


Figura 12. Perfil de monossacarídeos das cepas de *L. enriettii* (L88 e Cobaia). Controles utilizados como padrão foram os açúcares manose, glicose/N-acetil glicosamina e galactose (500µg/mL).

5.5. Análise da produção de NO em macrófagos murinos

Para determinar o perfil de produção de NO em macrófagos murinos das linhagens C57BL/6, TLR2 (-/-) e TLR4 (-/-) e possível participação de TLRs, estas células foram estimuladas com LPGs, GIPLs e formas promastigotas de ambas as cepas de *L. enriettii*. Nenhuma ativação foi observada para os parasitos vivos, meio de cultura e IFN- γ (Figura 12). Não houve diferença estatística em relação a síntese de NO no camundongo selvagem entre os LPGs das duas cepas, havendo entre os GIPLs ($p < 0.0001$). Nos camundongos Knock-outs, tanto os LPGs quanto os GIPLs da cepa L88 produziram maiores quantidades de NO.

Houve diferença na produção de NO ao se comparar os macrófagos C57BL/6 incubados com LPGs e GIPLs das duas cepas quando comparados aos Knock-outs ($p < 0.0001$). Esta ativação foi primariamente via TLR2 e secundariamente via TLR4. Nos macrófagos primados TLR2 (-/-) e TLR4 (-/-) incubados com LPGs e GIPLs das duas

cepas, existiu uma diferença estatística entre a produção de NO entre esses glicoconjugados. Os resultados apresentados representam dois experimentos em duplicata (Figura 12).

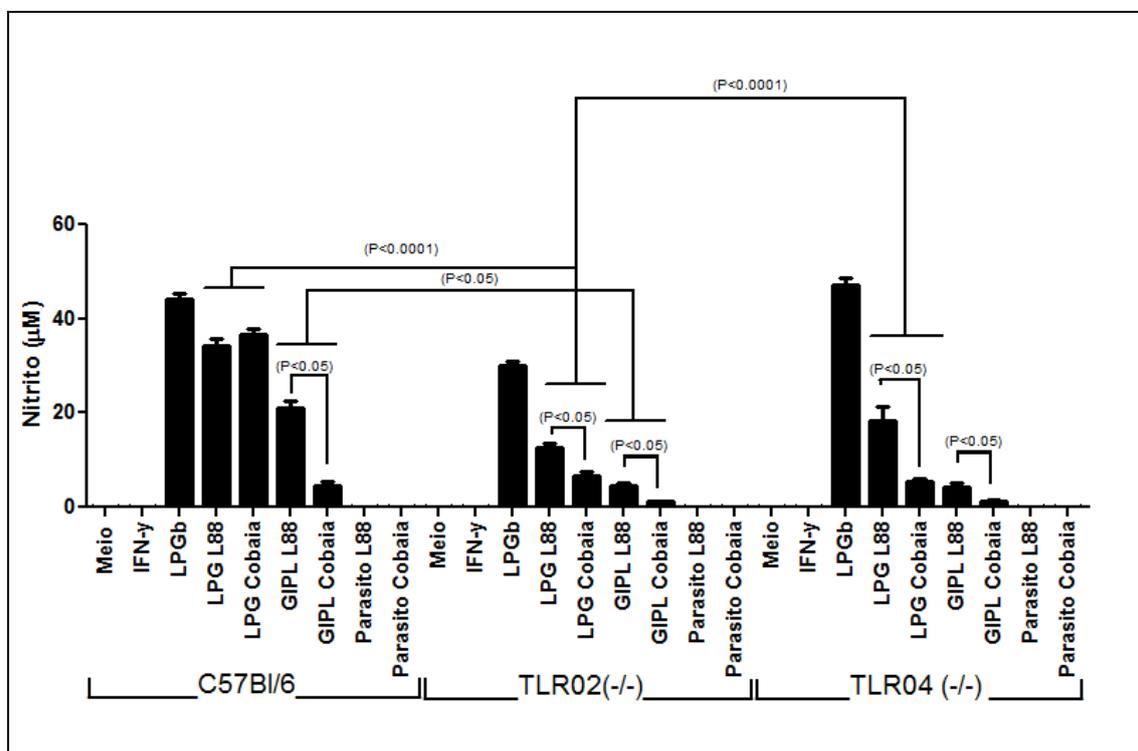


Figura 13. Produção de nitrito em macrófagos intraperitoneais murinos (C57Bl/6 TLR2 (-/-) e TLR4 (-/-)) primados com IFN- γ estimulados com LPGs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), GIPLs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e culturas de promastigotas (MOI 10:1) das cepas L88 e Cobaia de *L. enriettii* 48 horas. O LPG de *L. braziliensis* (100 ng/mL) foi utilizado como controle positivo. Os resultados representam a média de dois experimentos em duplicata.

5.6. Análise da produção de citocinas em macrófagos murinos

De maneira semelhante ao experimento de NO, os sobrenadantes de culturas de macrófagos das três linhagens de camundongo (C57BL/6, TLR2 (-/-) e TLR4 (-/-)) foram submetidos à citometria de fluxo para a dosagem das citocinas TNF- α , IL-10, IL-1 β , IL-6, e IL-12p40. Semelhante a resultados anteriores do nosso grupo (Assis et al., 2012b, Ibraim et al., 2013), não foi observada nenhuma produção de citocinas por parasitos vivos de ambas as cepas (Figura 13, 14). Da mesma maneira que foi observado para NO, a produção de TNF- α foi maior no LPG e GIPL da cepa L88 ($p < 0,05$) (Figura

13). Novamente, o papel de TRL2 nesta estimulação foi visível para os glicoconjugados das duas cepas de *L. enriettii*.

Não foram detectados níveis significativos para a produção das citocinas IL-10 e IL-1 β em nenhuma das linhagens de camundongos quando estimulados com LPGs, GIPLs e parasitos vivos. Somente foi detectado estimulação para os controles positivos (dados não mostrados).

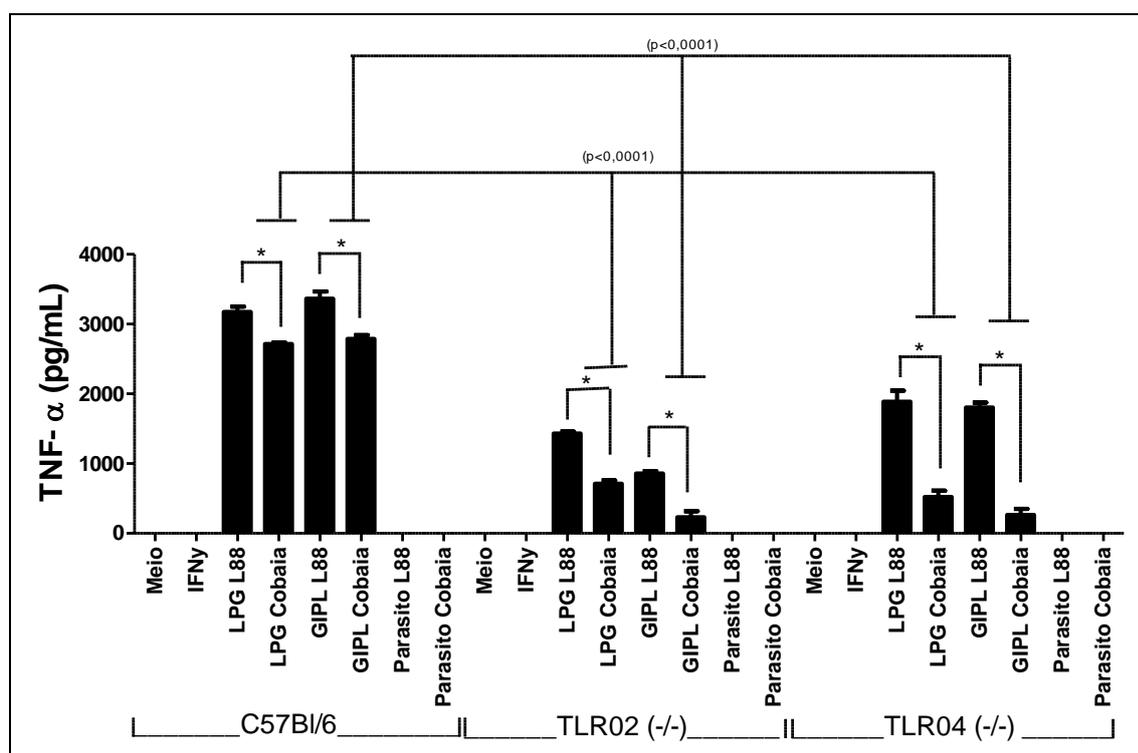


Figura 14. Produção de TNF- α em macrófagos intraperitoneais murinos (C57Bl/6 TLR2 (-/-) e TLR4 (-/-)) primados com IFN- γ estimulados com LPGs (10 μ g/mL), GIPLs (10 μ g/mL) e culturas de promastigotas (MOI 10:1) das cepas L88 e Cobaia de *L. enriettii* 48 horas. O LPG de *L. braziliensis* (100 ng/mL) foi utilizado como controle positivo. Os resultados representam a média de dois experimentos em duplicata. O símbolo * representa o valor $p < 0,05$.

De maneira semelhante a TNF- α , tanto o LPG, quanto os GIPLs da cepa L88 induziram uma produção mais alta de IL-6 do que os da cepa Cobaia nos macrófagos da linhagem C57BL/6 ($p < 0,05$). Para os macrófagos knock-out de TLR2 e TLR4 não foi observada a produção desta citocina nem pelos controles positivos (Figura 14a). De modo semelhantes aos experimentos anteriores, a produção de IL-12p40 foi maior pelo LPG

da cepa L88. A produção de IL-12p40 em macrófagos estimulados por GIPLs das duas cepas foi muito baixa (Figura 14b). A produção de IL-12p40 pelo GIPL da cepa Cobaia foi exclusivamente via TLR2. Esses resultados sugerem para estas citocinas uma provável cooperação entre TLR2 e TLR4.

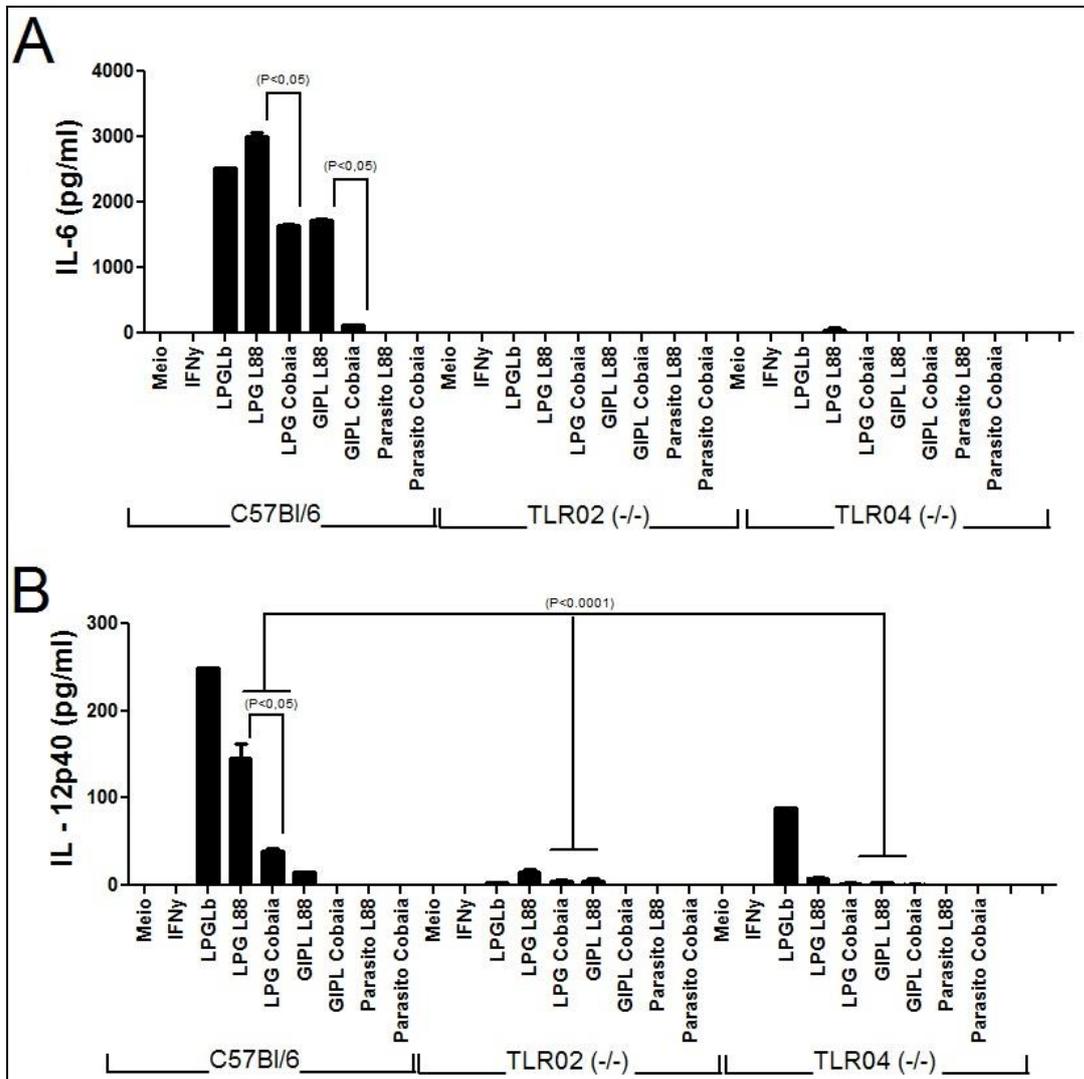


Figura 15. Produção de IL-6 e IL-12 p40 em macrófagos intraperitoneais murinos (C57Bl/6 TLR2 (-/-) e TLR4 (-/-)) primados com IFN- γ estimulados com LPGs (10 μ g/mL), GIPLs (10 μ g/mL) e culturas de promastigotas (MOI 10:1) das cepas L88 e Cobaia de *L. enriettii* 48 horas. O LPG de *L. braziliensis* (100 ng/mL) foi utilizado como controle positivo. Os resultados representam a média de dois experimentos em duplicata.

5.7. Análise da translocação de NF- κ B por LPGs e GIPLs

Considerando que TLR2 e TLR4 foram reconhecidos por LPGs e GIPLs das duas cepas de *L. enriettii*, o papel de cada um destes receptores foi avaliado isoladamente em

células CHO. Células CHO foram tratadas com LPGs e GIPLs durante 18 h e a expressão do repórter CD25 foi analisada por citometria de fluxo. Este sistema detecta a translocação do fator nuclear NF-kB.

Foi observado para os LPGs e os GIPLs das duas cepas a ausência de ativação dos receptores TLR2 e TLR4 (Figuras 15 e 16). Conforme esperado os controles positivos para TLR2 representados pelo LPG de *L. braziliensis* e lisado de *S. aureus* ativaram a translocação de NF-kB (Ibraim et al., 2013). O controle positivo para TLR4 representado por LPS também ativou NF-kB. O controle negativo representado pelo LPG de *L. infantum* (Ibraim et al., 2013) não ativou NF-kB. Estes resultados sugerem que tanto os LPGs quanto os GIPLs de *L. enriettii* necessitam de possível co-participação dos dois receptores (TLR2 e TLR4).

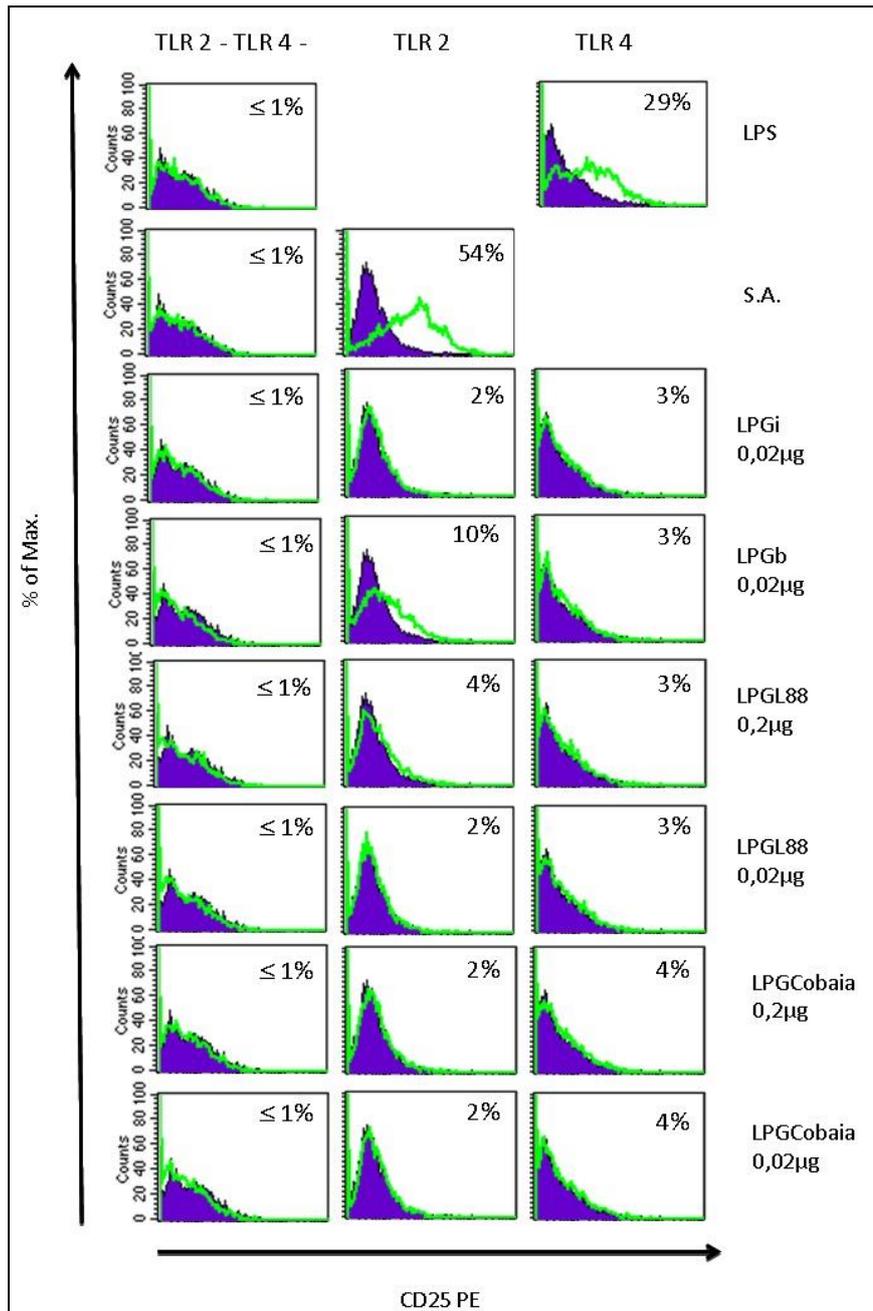


Figura 16. LPGs purificados a partir de duas cepas de *Leishmania enriettii* (L88 e Cobaia) induzindo a translocação de NFκB através de TLRs. As células CHO expressando TLR2 (TLR2 +), TLR4 (TLR4 +), ou nenhum (TLR2-/TLR4-) eram ou não tratada (linha cinza) ou expostas (linha preta) para LPS, *Staphylococcus aureus* (SA), LPG de *L. infantum* (LPGi), LPG de *L. braziliensis* (LPGb), LPG de *Leishmania enriettii* cepa L88 (LPGL88) ou LPG de *Leishmania enriettii* cepa Cobaia (LPGCobaia), como indicado. Expressão de CD25 foi medida por citometria de fluxo 18 h depois da estimulação. Percentagem = percentagem de expressão de CD25 em células estimuladas menos percentagem de expressão de CD25 em células não estimuladas.

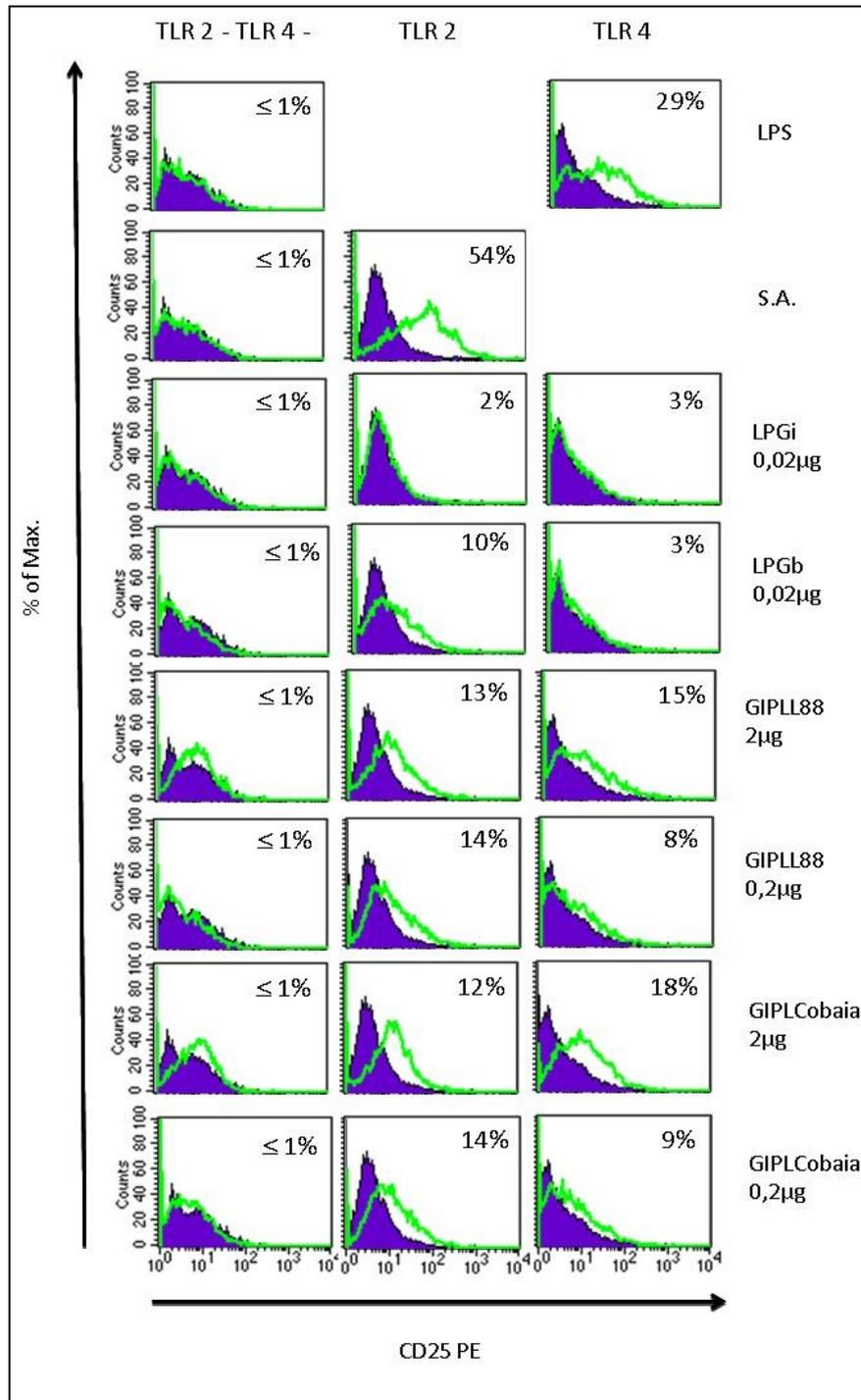


Figura 17. GIPLs purificados a partir de duas cepas de *Leishmania enriettii* (L88 e Cobaia) induzindo a translocação de NF- κ B através de TLRs. As células CHO expressando TLR2 (TLR2 +), TLR4 (TLR4 +), ou nenhum (TLR2-/TLR4-) eram ou não tratada (linha cinza) ou expostas (linha preta) para LPS, *Staphylococcus aureus* (SA), LPG de *L. infantum* (LPGi), LPG de *L. braziliensis* (LPGb), GIPL de *Leishmania enriettii* cepa L88 (GIPLL88) ou GIPL de *Leishmania enriettii* cepa Cobaia (GIPLCobaia), como indicado. Expressão de CD25 foi medida por citometria de fluxo 18 h depois da estimulação. Percentagem = percentagem de expressão de CD25 em células estimuladas menos percentagem de expressão de CD25 em células não estimuladas.

5.8. Infecção em *Cavia porcellus* usando duas cepas de *L.enriettii*

Como os glicoconjugados das duas cepas de *L. enriettii* apresentaram um perfil pró-inflamatório distinto nos experimentos *in vitro*. Parasitos vivos das duas cepas foram inoculados em *C. porcellus* para avaliação de sua infectividade *in vivo*.

Não foi observada mortalidade durante todo o período de observação (91 dias) com *L. enriettii*. Não houve diferença estatística entre os pesos do grupo 1 e 2 (Figura 17) ao longo de todo experimento. Resultado também apresentado para os grupos 3 e 4 (Figura 18) Estes resultados atestam o bom estado dos animais durante todo o experimento.

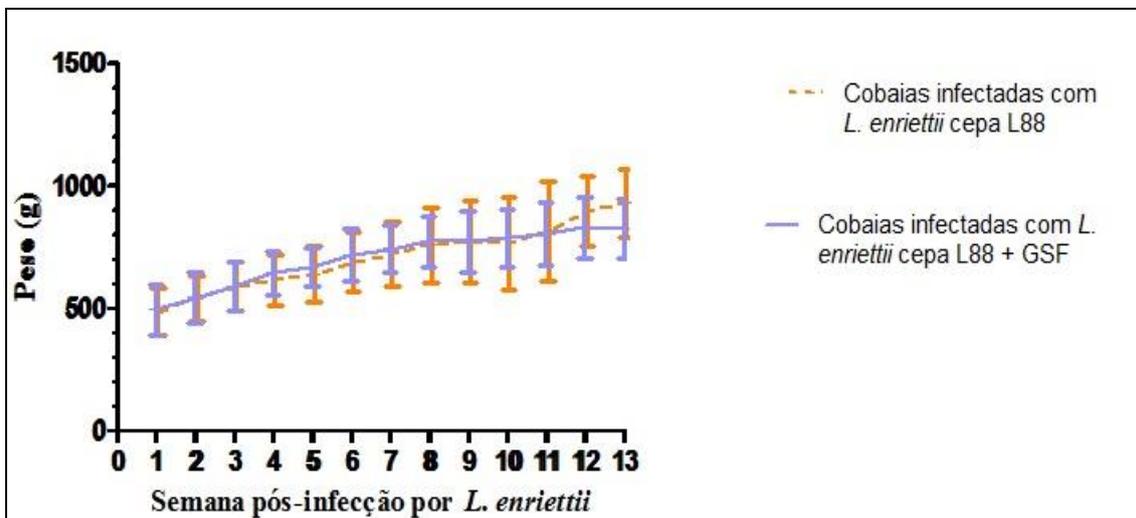


Figura 18. Avaliação do peso do grupo 1 (infectados com *L.enriettii* cepa L88) e grupo 2 (infectados com *L.enriettii* cepa L88 + GSF). Machos de cobaias foram inoculados na narina com 1×10^6 promastigotas de *L. enriettii* cepa L88. Semanalmente, foi acompanhado o desenvolvimento do peso. São apresentados a média e o desvio-padrão de todos os 5 animais que faziam parte do grupo 1 e 2. Os dados foram analisados usando teste t, não indicando diferença estatística ($p < 0,05$)

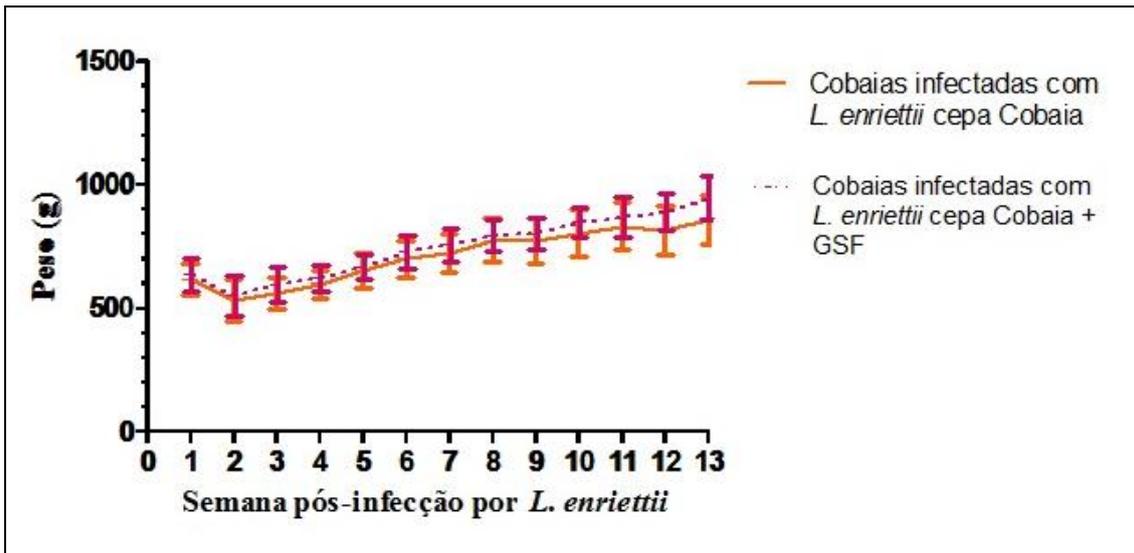


Figura 19. Avaliação do peso do grupo 3 (infectados com *L.enriettii* cepa Cobaia) e grupo 4 (infectados com *L.enriettii* cepa Cobaia + GSF). Machos de cobaias foram inoculados na narina com 1×10^6 promastigotas de *L. enriettii* cepa L88. Semanalmente, foi acompanhado o desenvolvimento do peso. São apresentados a média e o desvio-padrão de todos os 5 animais que faziam parte do grupo 3 e 4. Os dados foram analisados usando teste t, não indicando diferença estatística ($p < 0,05$).

Em relação às lesões, a cepa Cobaia não causou lesão evidente. Entretanto, todos animais apresentaram protuberância (Figura 19F). Deste modo, as análises das lesões foram restritas apenas à cepa L88 (Figuras 19A-E, 20, Tabela 4). Os animais infectados começaram a desenvolver protuberância e/ou lesão a partir da quarta e/ou quinta semana de infecção (Figura 20, Tabela 4). Houve diferença estatística entre o tamanho das lesões desenvolvidas pelo grupo 1 em relação ao grupo 2 ($p < 0,05$) (Figura 20). O grupo 1, teve uma média de área da lesão igual à $294,2 \text{ mm}^2$ e o período de aparecimento e cura da lesão foi em torno de seis semanas, enquanto o grupo 2 obteve um valor $477,2 \text{ mm}^2$ e um período maior de dez semanas. A partir da nona semana pós-infecção, observou-se uma redução gradual na área da lesão desencadeada pela *L. enriettii* cepa L88, que culminou com ausência de lesão detectável a partir da décima terceira semana pós-infecção (Tabela 4). Estes dados mostram que a infecção juntamente com extrato de glândula salivar de flebotomíneo (GSF) exacerbou a infecção, aumentou o tempo de desenvolvimento e cicatrização das lesões.

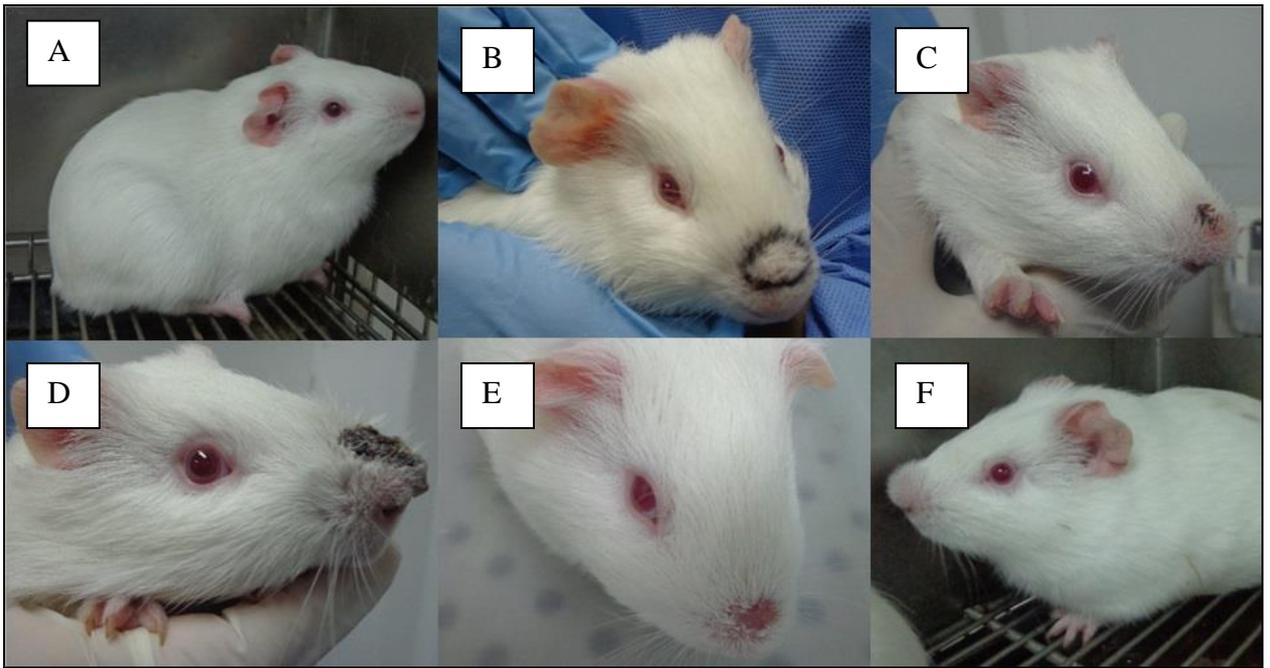


Figura 20. Curso do surgimento e cicatrização das lesões. Machos de cobaias foram inoculados na narina com 1×10^6 promastigotas de *L. enriettii* cepa L88 e Cobaia. A – *Cavia porcellus* não infectado. B – *Cavia porcellus* infectado com a cepa L88 (4 semanas de infecção). C – *Cavia porcellus* infectado com a cepa L88 (5 semanas de infecção). D – *Cavia porcellus* infectado com a cepa L88 + GSF (7 semanas de infecção). E – *Cavia porcellus* infectado com a cepa L88 (8 semanas de infecção). F – *Cavia porcellus* infectado com a cepa Cobaia (protuberância desenvolvida após 4 semanas de infecção).

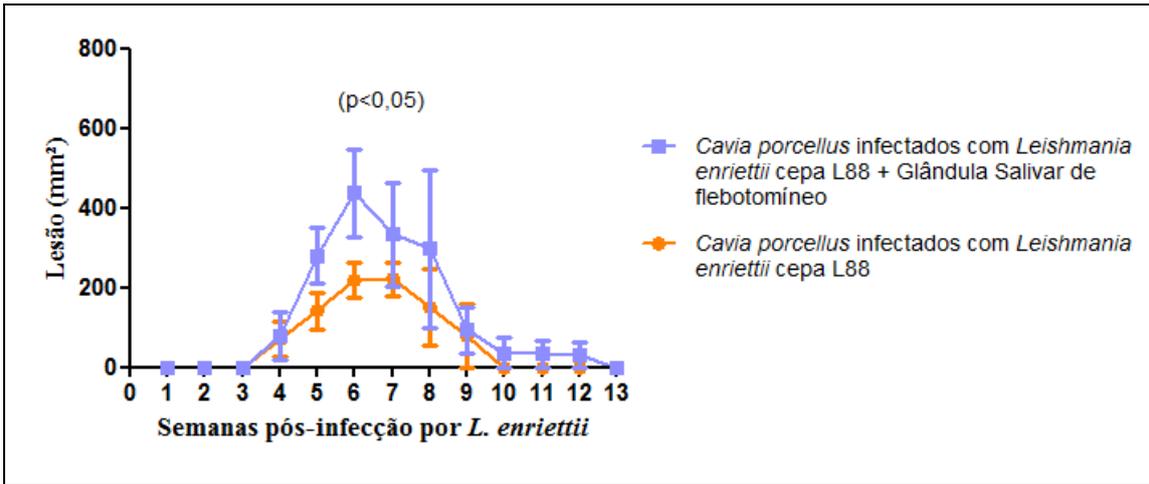


Figura 21. Curva de desenvolvimento de lesão em cobaias do grupo 1 (Grupo de cobaias infectados com *L. enriettii* cepa L88) e do grupo 2 (Grupo de cobaias infectados com *L. enriettii* cepa L88 + GSF). Machos de cobaias foram inoculados na narina com 1×10^6 promastigotas de *L. enriettii* cepa L88. Semanalmente, foi acompanhado o desenvolvimento da lesão, que foram demarcadas com caneta esferográfica preta no focinho da cobaia e sua impressão foi realizada sobre uma folha de papel filtro com auxílio de álcool. As áreas das impressões das lesões das cobaias foram medidas com auxílio de uma régua. São apresentados a média e o desvio-padrão de todos os 5 animais que faziam parte do grupo 1 e 2. Os dados foram analisados usando teste t, indicando diferença estatística ($p < 0,05$).



DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Esse trabalho propôs pela primeira vez estudar duas cepas do protozoário *L. enriettii* isoladas em diferentes períodos. Antes desse estudo, desconhecia-se o perfil de crescimento dessa espécie, o curso e o padrão das lesões causadas pela infecção, a constituição bioquímica de seus glicoconjugados (LPG e GIPL), a produção de NO e citocinas, os receptores envolvidos nesta ativação e a infectividade *in vivo* para seu hospedeiro natural.

As duas cepas de *L. enriettii* atingiram um crescimento menor que do observado em trabalhos anteriores de nosso grupo para *L. infantum* e *L. braziliensis* não alcançando densidade superior a 1×10^7 células/mL. A cepa Cobaia apresentou crescimento maior do que a cepa L88, embora ambas tenham atingido a fase estacionária no 10º dia de cultivo. *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1975/2903) atingiu a fase estacionária no sexto dia (2×10^7 parasitos/ml) enquanto que *L. infantum* (MHOM/BR/70/BH46) apresentou um pico máximo no nono dia ($1,3 \times 10^7$ parasitos/mL) (Ibraim et al., 2012). Deste modo, escolhemos o 10º dia para a extração dos glicoconjugados.

Trabalhos que buscam compreender e explicar os mecanismos de interação de *Leishmania* com seus hospedeiros constituem uma ferramenta importante no entendimento da biologia deste parasito. Dentre as moléculas que podem auxiliar no sucesso da infecção desse protozoário ao ambiente hostil presente nos hospedeiros vertebrados e invertebrados pode-se destacar o papel fundamental dos glicoconjugados (Turco, 2003).

O termo “glicoconjugados” refere-se a qualquer molécula que possua algum motivo de carboidrato ligado covalentemente a outra classe de moléculas como lipídeos e proteínas. Dentre eles, o lipofosfoglicano (LPG), que é o glicoconjugado de *Leishmania*

que apresenta maior número de estudos em espécies do Velho Mundo (McConville & Ferguson, 1993; Schneider et al., 1994; Sacks et al., 1995; Zawadzki et al., 1998; Soares et al., 2004) e mais recentemente no Novo Mundo (Soares et al., 2002; Soares et al., 2005; Coelho-Finamore et al., 2011; Assis et al., 2012a; Ibraim et al., 2013).

Dentre os LPGs da cepa do Novo Mundo, objeto do nosso estudo já são conhecidos os das espécies *L. mexicana* (Ilg et al., 1992), *L. infantum* (Soares et al., 2002), *L. braziliensis* (Soares et al., 2005) e cepas de *L. infantum* (Coelho-Finamore et al., 2011). O LPG de *Leishmania mexicana* (Ilg et al., 1992), caracteriza-se por possuir uma β -glicose ligada aos resíduos de galactoses das unidades repetitivas. O LPG de *L. infantum* (cepa PP75) apresentou uma β -glicose nas cadeias laterais das unidades repetitivas, após a metaciclogênese, esta β -glicose desaparece (Soares et al., 2002). Em *L. braziliensis* acontece o oposto, as formas procíclicas não possuem cadeias laterais e as metacíclicas possuem 1-2 β -glicoses, sendo este tipo de metaciclogênese nunca observado em outra espécie de *Leishmania* (Soares et al., 2005). Mais recentemente o polimorfismo da molécula do LPG de 17 cepas de *L. infantum* foi caracterizado e divididos em 3 tipos: I) sem cadeias laterais; II) com uma cadeia lateral de glicose e III) com até 3 cadeias laterais de glicose (Coelho-Finamore et al., 2011). O LPG das duas cepas de *L. enriettii* apresentam o mesmo padrão encontrado na região de unidades repetitivas do LPG de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) (Soares et al., 2005). Porém esses LPGs não são semelhantes, visto no *Western-Blot*, o LPG da cepa L88 apresenta uma cadeia mais longa de unidades repetitivas que o LPG da cepa Cobaia (Figura 21).

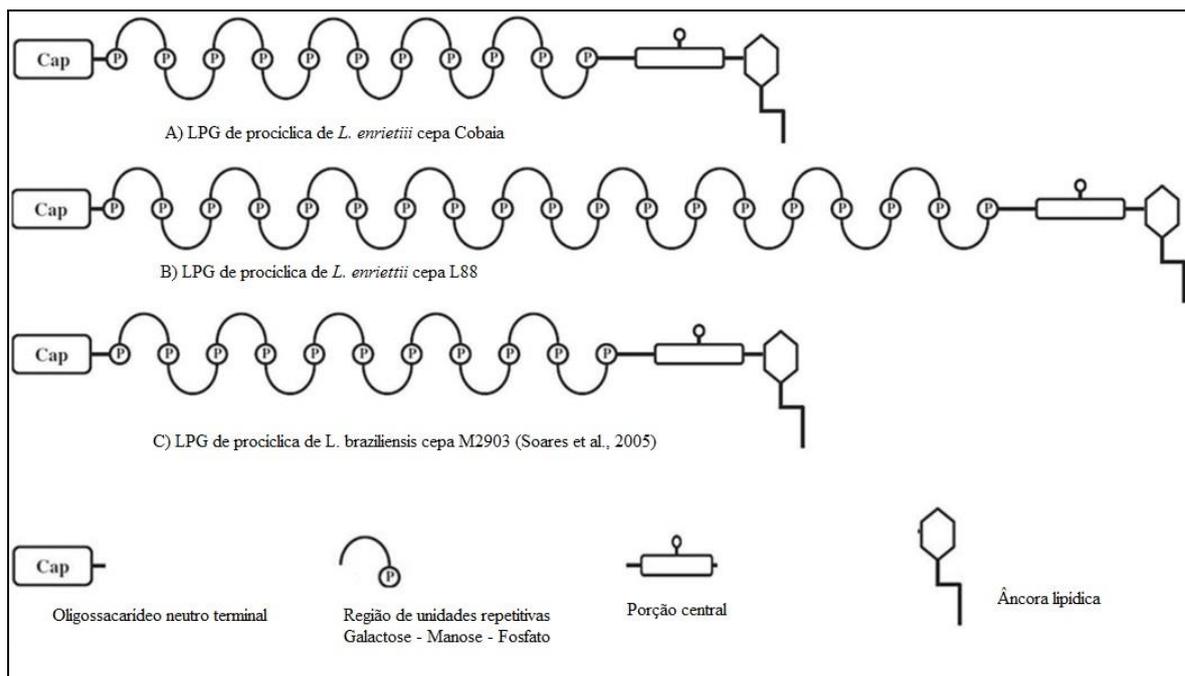


Figura 22. Diagrama esquemático do LPG de *L. enriettii* procíclicas. A estrutura da porção central é Gal ($\alpha 1, 6$) Gal ($\alpha 1, 3$) Galf ($\alpha 1, 3$) [Glc ($\alpha 1$ -PO₄) -6]-Man ($\alpha 1, 3$) Man ($\alpha 1, 4$) GlcN ($\alpha 1, 6$), ligado a uma âncora lipídica de 1-*O*-alquil-2-liso-fosfatidilinositol. As unidades repetitivas são 6-Gal ($\beta 1, 4$) Man ($\alpha 1$)-PO₄. Os números precisos de Galactose, Manose e Fosfato da região de unidades repetitivas dos LPGs de *L. enriettii* não são conhecidos e a constituição do Cap. P = fosfato.

Trabalhos anteriores da literatura definiram que os GIPLs de *Leishmania* podem ser classificados em tipo I, II e híbridos (revisado por Assis et al., 2012a). Os GIPLs do tipo I, em sua maioria apresentam um resíduo de manose como açúcar mais distal é identificado pela substituição do sexto carbono da manose proximal por um resíduo de manose (Man $\alpha 1$ -6Man $\alpha 1$ -4GlcN-PI). Os GIPLs do tipo I são a forma predominante em *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica* e *Leishmania aethiopica* (Schneider et al. 1994). Os GIPLs do tipo II possuem como característica a substituição do terceiro carbono da manose proximal por um resíduo de manose (Man $\alpha 1$ -3Man $\alpha 1$ -4GlcN-PI). Estes GIPLs são comumente encontrados em *Leishmania major*, *Leishmania mexicana* (Mcconville & Ferguson, 1993) e *Leishmania panamensis*. O terceiro grupo, dos GIPLs híbridos, compartilha características estruturais com os dois primeiros tipos e possuem adição de uma manose em no terceiro e sexto carbono da manose proximal (Man $\alpha 1$ -

3(Man α 1-6)Man α 1-4GlcN-PI) encontrados em *L. mexicana* e *L. donovani* (Mcconville & Ferguson, 1993). Em nosso trabalho, os GIPLs das duas cepas possuem diferenças marcantes. O da cepa L88 é caracterizado por ser um GIPL rico em galactose, semelhante ao GIPL do tipo II. O GIPL da cepa Cobaia possuiu uma composição rica em glicose, uma característica nunca observada anteriormente. Estas diferenças refletiram no padrão de ativação dos macrófagos quando estimulados com os GIPLs das duas cepas durante os eventos iniciais da infecção.

Quando um hospedeiro vertebrado é infectado com o protozoário *Leishmania*, o reconhecimento dessas células invasoras é realizado pelos PAMPS e os receptores do tipo TLRs. Os receptores utilizados pela *Leishmania* sp. são TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 (Tuon et al., 2008; Assis et al. 2012a; Faria et al., 2012). A ativação destes receptores é dependente de uma proteína adaptadora denominada MyD88 e está associada a produção de citocinas pró-inflamatórias (Becker et al., 2003; De Veer et al., 2003; Ibraim et al., 2013). Algumas citocinas comprovadamente sintetizadas por essa parasitose podem ser citadas: TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12 e NO.

O papel de NO no controle de infecções por *Leishmania* e sua modulação, tem sido objeto de estudo em vários trabalhos. Camundongos que não expressam óxido nítrico sintase induzível (iNOS) foram incapazes de controlar a infecção por *L. major* (Wei et al., 1995). Estudo demonstrou que o LPG sinergicamente com IFN- γ regulou a expressão de iNOS em macrófagos de camundongos. No entanto, a incubação de macrófagos com LPG antes da ativação com IFN- γ conduziu na inibição da expressão de iNOS. A expressão do iNOS está diretamente relacionada com a atividade leishmanicida dos macrófagos. A atividade reguladora de iNOS pelo LPG é regulada pela porção PG da estrutura do seu LPG (Proudfoot et al., 1996).

O LPG da cepa L88 caracteriza-se por ter uma longa cadeia de unidades repetitivas e maior peso molecular do que a da cepa Cobaia. Não houve diferença estatística da produção de NO pelos LPGs das duas cepas nos camundongos selvagens, porém nos camundongos Knock-outs houve maior produção de NO tanto pelo LPG quanto pelo GIPL da cepa L88. Esses resultados estão de acordo com a literatura, que demonstraram em estudo usando macrófagos murinos primados com INF- γ expostos a diferentes LPGs de *L. infantum* e de *L. major*, que os LPGs mais complexos estimularam uma produção mais elevada de NO (Proudfoot et al., 1996; Coelho-Finamore et al., 2011).

Trabalhos anteriores utilizando GIPLs das espécies *L. major*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, demonstraram o papel anti-inflamatório desse glicoconjugado de inibir a produção de NO quando estimulados com IFN- γ e LPS, reduzindo a atividade leishmanicida (Proudfoot et al., 1995; Assis et al., 2012b). Este perfil não foi observado aqui, sendo que os GIPLs das duas cepas de *L. enriettii* foram capazes de sintetizar significativamente níveis de NO e das outras citocinas. O GIPL da cepa L88 produziu uma maior quantidade de NO que o GIPL da cepa Cobaia, sendo mais pró-inflamatório. Este papel pode ser devido à sua estrutura rica em galactoses.

Receptores do tipo Toll (TLR) são proteínas localizadas na membrana plasmática e em membranas internas de macrófagos, células dendríticas e células NK, além de estarem presentes na membrana de linfócitos T e B. Existem atualmente 13 TLRs de mamíferos descritos, enquanto TLRs 1-9 são funcionalmente conservadas entre os seres humanos e camundongos, TLR10 parece ser exclusivo de seres humanos, mas divergente no C-terminal em camundongos, tornando-a inoperante. TLR11 é funcional no camundongo, mas ausente em humano (Kaye & Aebischer, 2011). Dependendo do tipo de receptor Toll, do parasito, do momento da infecção e do tipo celular, a presença dessa proteína de membrana poderá favorecer o desenvolvimento ou controle de uma infecção.

A ativação de NO no presente estudo pelos LPGs e GIPLs das duas cepas de *L. enriettii*, foi preferencialmente via TLR2 e secundariamente via TLR4. Os dados de GIPLs diferem-se dos encontrados na literatura em espécies do Velho (Proudfoot L et al 1995) (Proudfoot L et al., 1996) e Novo Mundo (Assis et al., 2012b), que demonstraram essa ativação ser principalmente através de TLR4 e, em menor medida, TLR2.

TLR2 foi o primeiro a ser incriminado como o receptor de LPG em macrófagos e em células NK (De Veer et. al., 2003) (Becker et al., 2003). *In vivo*, camundongos TLR4 (-/-) são mais suscetíveis as infecções por *Leishmania*, não conseguindo conter eficientemente o desenvolvimento de lesões (Kropf et al., 2004) enquanto TLR2 mostra ter um papel mais regulador em células dendríticas infectadas com *L. braziliensis* (Vargas-Inchaustegui et al., 2009). Macrófagos primados com IFN- γ estimulados com LPG de *L. braziliensis* e *L. infantum* não produziram quantidade significativa de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- γ , em contrapartida, sintetizaram significativamente TNF- α , IL-1 β e IL-6. A espécie *L. braziliensis* produziu maior quantidade de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e NO comparado com a outra espécie estudada. O trabalho sugeriu que os dois LPGs foram capazes de modular diferencialmente as funções dos macrófagos, havendo participação preferencial de TLR2 e secundariamente TLR4 (Ibraim et al., 2013). Porém ao se utilizar células CHO transfectadas isoladamente com TLR2 e TLR4, foi observado que apenas o LPG de *L. braziliensis* foi um agonista de TLR2 confirmando os resultados de Becker et al. (2003) e de Veer et al. (2003).

Macrófagos primados com IFN- γ estimulados com GIPLs demonstraram que esses glicoconjugados de *L. braziliensis* e *L. infantum* estimularam pequenas quantidades de NO e TNF- α , via TLR4. Os GIPLs foram considerados moléculas inibidoras de citocinas, favorendo a sobrevivência do parasito dentro do hospedeiro vertebrado (Assis et al., 2012b). Em nosso trabalho, foi observado um perfil diferente. Embora os GIPLs

tenham sido capazes de estimular a produção de NO e TNF- α , foi também observada a produção de IL-6 e IL-12 p40 em macrófagos primados com IFN- γ e estimulados com LPGs e GIPLs das duas cepas de *L. enriettii*. Esses achados podem estar relacionados à espécie de *Leishmania*. Esta ativação foi preferencialmente pelo receptor TLR2 e secundariamente TLR4. Não foram detectados níveis significativos das citocinas IL-10 e IL-1 β em nenhuma das linhagens de camundongos. Deste modo, o parasito e suas moléculas foram capazes de modular diferencialmente a produção de NO e citocinas em macrófagos murinos.

Avaliando isoladamente o papel de cada TLR, utilizando células CHO foi observado que os LPGs e os GIPLs não foram capazes de ativar TLR2 e TLR4, sugerindo uma co-participação dos dois receptores. É sabido que para os lipopeptídeos de bactérias e para as GPI-mucinas de *T. cruzi* (Gazzinelli & Denkers, 2006) podem ocorrer dimerização entre TLR1/6 e TLR2/6 propiciando uma melhor ativação (Kumagai & Akira, 2010). Resultados semelhantes foram observados também para os LPGs de *L. infantum* e *L. braziliensis* (Ibraim et al., 2013). Entretanto, o fenômeno de dimerização entre TLR2/4 ainda é desconhecido e deverá ser mais bem explorado com os LPGs e GIPLs das duas cepas de *L. enriettii* estudadas no presente trabalho.

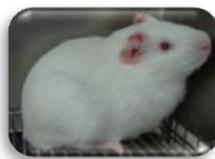
Considerando que diferentes espécies de *Leishmania* e até mesmo cepas isoladas de uma mesma espécie podem levar a diferentes manifestações clínicas em um mesmo hospedeiro (Teixeira et al., 2011) e que morbidade e a forma clínica da doença estão diretamente relacionadas à virulência do parasita, bem como ao status imunológico dos hospedeiros fez-se necessário um estudo mais específico em relação a espécie *L. enriettii*.

Para se conhecer e descrever o perfil de infecção da *L. enriettii* foi utilizado duas cepas (MCAV/BR/1945/L88 e MCAV/BR/1985/COBAIA_SP) que foram isoladas de *Cavia porcellus* em dois momentos diferentes no Estado do Paraná e São Paulo, respectivamente, Brasil. Os animais escolhidos como modelo foram machos de *Cavia porcellus*. Trabalhos anteriores demonstraram que pequenas quantidades de saliva de flebotomíneos poderiam aumentar a infecção quando co-inoculadas com promastigotas de *Leishmania* spp (Titus & Ribeiro, 1988; Belkaid et al., 1998; Laurenti et al., 2009a; Laurenti et al., 2009b). Propondo um modelo mais próximo do que ocorre na natureza foi realizado um estudo de infecção usando GSF associada ou não a cada uma das cepas estudadas.

Os animais infectados com a cepa Cobaia não desenvolveram lesão ulcerada, enquanto animais infectados com a cepa L88 desenvolveram lesão ulcerada a partir da quarta e/ou quinta semana de infecção. Os animais do grupo 2 desenvolveram lesões maiores que infecções exclusivamente com os parasitos da cepa L88, havendo um aumento da área em mm², quando associados a GSF, de cerca de 38,35 %. Esses dados estão de acordo com os encontrados na literatura que comprovaram que em alguns modelos a saliva de *L. longipalpis* tem a capacidade de aumentar a área da lesão e o tempo de cicatrização da lesão (Brown & Rosalsky, 1984; Theodos et al., 199 ; Sádlová, 1999; Donnely et al., 1998; Melo et al., 2001).

A *L. enriettii* cepa L88 caracterizou-se por ter um LPG com uma região de unidades repetitivas longa, tanto os LPGs quanto seus GIPLs produziram maiores quantidades de NO e citocinas em camundongos Knock-outs. O LPG e o GIPL da cepa L88 foram capazes de desencadear a produção de maiores quantidades de TNF- α , IL-6 e IL-12p40 em comparação com a cepa Cobaia ($p < 0,05$). Estes resultados *in vitro* foram confirmados *in vivo*, onde a cepa L88 foi capaz de desenvolver lesão ulcerativa.

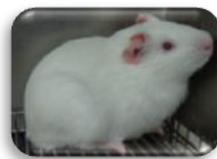
Estes resultados demonstram que as cepas de *L. enriettii* isoladas em dois períodos distintos diferem entre si na estrutura dos seus glicoconjugados, no perfil pró-inflamatório e de infectividade para o seu hospedeiro vertebrado. Este trabalho é parte de um projeto maior que pretende elucidar aspectos desconhecidos da glicobiologia de espécies de *Leishmania* do Novo Mundo.



CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- O LPG das cepas de *L. enriettii* não possuem cadeias laterais;
- O LPG da cepa L88 possui a região de unidades repetitivas do LPG mais longa do que da cepa Cobaia;
- Ocorreram variações intra-específicas nos GIPLs de *L. enriettii*, o GIPL da cepa L88 é rico em galactose (similar ao tipo II), enquanto que o GIPL da cepa Cobaia é rico em glicose, um GIPL ainda não descrito.
- Tanto os LPGs quanto os GIPLs foram capazes de estimular a produção de NO e citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-12p40) em macrófagos murinos via TLR2 e secundariamente via TLR4;
- Não foram detectados níveis significativos para a produção das citocinas IL-10 e IL-1 β em macrófagos estimulados com LPGs e GIPLs e *L. enriettii*;
- Os LPGs e GIPLs da cepa L88 tiveram um perfil mais pró-inflamatório do que os da cepa Cobaia;
- LPGs e os GIPLs não foram capazes de ativar TLR2 e TLR4 em células CHO separadamente, sugerindo uma co-participação dos dois receptores.
- A cepa L88 foi a única capaz de desenvolver lesões ulcerativas em *Cavia porcellus*. Estas lesões foram mais exacerbadas na presença de glândula salivar de flebotomíneo.



REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS:

- Achterberg V, Gercken G 1987. Cytotoxicity of ester and ether lysophospholipids on *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*; 23: 117–122.
- Assis RR, Ibraim IC, Noronha FS, Turco SJ, Soares RP 2012b. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: Modulation of Innate Immune System and Variations in Carbohydrate Structure. *PLoS Negl Trop Dis*; 6: e1543.
- Barron TL, Turco SJ 2006. Quantitation of Leishmania Lipophosphoglycan Repeat Units by Capillary Electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 1760: 710–714.
- Barton GM, Medzhitov 2003. Toll-like receptor signaling pathways. *Science*; 300: 1524–1525.
- Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres AP, Cabrera N, González A, Maldonado C, Isibasi A 2003. “*Leishmania* Lipophosphoglycan (LPG) Activates NK Cells Through Toll-like Receptor-2.” *Mol Biochem Parasitol*. 130: 65–74.
- Belehu A, Poulter LW, Turk JL 1976. Modification of cutaneous Leishmaniasis in the guinea-pig by cyclophosphamide. *Clin Exp Immunol*; 24: 125–132.
- Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks DL 1998. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva pre exposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Biol Chem*; 188: 1941–1953.
- Bogdan C, Rölinghoff M 1999. How Do Protozoan Parasites Survive Inside Macrophages. *Parasitol Today*; 15: 22–28.
- Brito AS 1994 Manual dos ensaios toxicológicos in vivo. Editora UNICAMP.
- Brittingham A, Mosser DM. 1996 Exploitation of the Complement System by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol Today*; 12: 444–447.
- Brown SJ, Rosalsky JH 1984. Blood leukocyte response in hosts parasitized by the hematophagous arthropods *Triatoma protracta* and *Lutzomyia longipalpis*. *Am J Trop Med Hyg*, 33: 499-505.
- Bryceson AD 1970. Immunity in cutaneous leishmaniasis of the guinea-pig. *Clin. exp. Immunol*; 7: 301 – 341.

- Coelho-Finamore JM, Freitas VC, Assis RR, Melo MN, Novozhilova N, Secundino NF, Pimenta PF, Turco SJ, Soares RP, J. M.; et al. 2011. *Leishmania infantum*: lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. *Int J Parasitol* ;41: 811–820.
- Dantas-Torres Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M, Otranto D 2012. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol*; 28: 531–538.
- de Assis RR, Ibraim IC, Nogueira PM, Soares RP, Turco SJ 2012a. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Acta Biochim Biophys*; 13: 1–12.
- de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, Handman E, Schofield L 2003. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling, *Eur. J. Immunol.* 33: 2822–2831.
- Delude RL, Yoshimura A, Ingalls RR, Golenbock DT 1998. Construction of a lipopolysaccharide reporter cell line and its use in identifying mutants defective in endotoxin, but not TNF-alpha, signal transduction. *J Immunol.* 161 : 3001 – 3009.
- Dermine JF, Goyette G, Houde M, Turco SJ, Desjardins M 2005. *Leishmania donovani* Lipophosphoglycan Disrupts Phagosome Microdomains in J774 Macrophages. *Cell Microbiol*; 7: 1263–1270.
- Dermine JF, Scianimanico S, Privé C, Descoteaux A, Desjardins M 2000. *Leishmania* promastigotes Require Lipophosphoglycan to Actively Modulate the Fusion Properties of Phagosomes at an Early Step of Phagocytosis. *Cell Microbiol*; 2: 115–126.
- Descoteaux A, Turco SJ 1999. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta*; 1455: 341–352.
- Desjeux P 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol. Infect Dis* 27: 305 – 318.
- Donnelly KB, Lima HC, Titus RG 1998. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. *J. Parasitol.* 84: 97 – 103.

- Dougall AM, Alexander B, Holt DC, Harris T, Sultan AH, Bates PA, Rose K, Walton SF 2011. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *Int J Parasitol*; 41:571–579.
- Dubois M, Gilles K, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem*; 28: 350 – 356.
- Faria MS, Reis FC, Lima AP 2012. Toll- like Receptors in *Leishmania* Infections: Guardians or Promoters? *J Parasitol Res*; 10: 1–12.
- Feng GJ, Goodridge HS, Harnett MM, Wei XQ, Nikolaev AV, Higson AP, Liew FY 1999. Extracellular Signal-related Kinase (ERK) and P38 Mitogen-activated Protein (MAP) Kinases Differentially Regulate the Lipopolysaccharide-mediated Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase and IL-12 in Macrophages: *Leishmania* Phosphoglycans Subvert Macr. *J Immunol*; 163: 6403–6412.
- Gazzinelli RT, Denkers EY 2006. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol* 6: 895–906.
- Greenberg ME, Ziff EB 1984. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature*; 311: 433–438.
- Grimaldi G Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D 1989. A review of geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg* 41: 687–725.
- Guerra JA, Barbosa MG, Loureiro AC, Coelho CP, Rosa GC, Coelho LI 2007. Leishmaniose tegumentar americana em crianças: aspectos epidemiológicos de casos atendidos em Manaus, Amazonas, Brasil. *Cad Saúde Pública*; 23: 2215–2223.
- Guimarães-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: 6748–6753.
- Homans SW, Mehlert A, Turco SJ 1992. Solution structure of the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. *Biochemistry*; 31: 654–661.
- Ibraim IC, de Assis RR, Pessoa NL, Campos MA, Melo MN, Turco SJ, Soares RP 2013. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasites & Vectors*. 6: 1 – 11.

- Ilg T, Etges R, Overath P, McConville MJ, Thomas-Oates J, Thomas J, Homans SW, Ferguson MA 1992. Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan. The journal of biological chemistry. 267: 6834-6840.
- Kawai T, Akira S 2011. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. Immunity; 34: 637–650.
- Kaye P, Akira S 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity.34: 637 – 650.
- Kaye PM, Aebischer T 2011. Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. Clinical Microbiology and Infection. 17: 1462–1470.
- Killick-Kendrick R 1979. Biology of *Leishmania* in phlebotomine sand fly. In: Biology of the kinetoplastida. Academic Press; 2: 395–460.
- Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazzi S, Galanos C, Smith DF, Müller I 2004. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. Infect Immun.72: 1920–1928.
- Kumagai Y, Akira S 2010. Identification and functions of pattern-recognition receptors. J Allergy Clin Immunol; 125: 985-92.
- Lainson R, Shaw JJ 1997. Evolution, classification and geographical distribution. The leishmaniasis in biology and medicine. Biology and Epidemiology; 1: 1–120.
- Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Ready PD, Naiff RD 1979. Leishmaniasis in Brazil. XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. Trans R Soc Trop Med Hyg; 73: 239–242.
- Laurenti MD, da Matta VL, Pernichelli T, Secundino NF, Pinto LC, Corbett CE, Pimenta PP 2009a. Effects of Salivary Gland Homogenate from Wild-Caught and Laboratory-Reared *Lutzomyia longipalpis* on the Evolution and Immunomodulation of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Infection. Scand J Immunol. 70: 389 – 395.
- Laurenti MD, Silveira VM, Secundino NF, Corbett CE, Pimenta PP 2009b. Saliva of laboratory-reared *Lutzomyia longipalpis* exacerbates *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection more potently than saliva of wild-caught *Lutzomyia longipalpis*. Parasitol International; 58: 220 – 226.
- Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT 1999. Toll-like receptor 2 functions as a

- pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem.* 274 : 33419 – 33425.
- Lillico S, Field MC, Blundell P, Coombs GH, Mottram JC 2003. Essential Roles for GPI-anchored Proteins in African Trypanosomes Revealed Using Mutants Deficient in GPI8. *Mol Biol Cell*; 14: 1182–1194.
- Lobato Paraense 1953. The spread of *Leishmania enriettii* through the body of the guinea pig. *Tropical medicine and hygiene*; 47: 556 – 566.
- Luz E, Giovannoni M, Borba AM 1967. Infecção de *Lutzomyia monticola* por *Leishmania enriettii*. Na Faculdade de Medicina Universidade Federal do Paraná; 9: 121–128.
- Luz NF, Andrade BB, Feijó DF, Araújo-Santos T, Carvalho GQ, Andrade D, Abánades DR, Melo EV, Silva AM, Brodskyn CI, Barral-Netto M, Barral A, Soares RP, Almeida RP, Bozza MT, Borges VM 2012. Heme Oxygenase-1 Promotes the Persistence of *Leishmania chagasi* Infection. *J Immunol*; 188: 4460–4467.
- Machado MI, Milder RV, Pacheco RS, Silva M, Braga RR, Lainson R 1994. Naturally acquired infections with *Leishmania enrietti* Muniz and Medina 1948 in guinea-pigs from São Paulo, Brazil. *Parasitology*; 109: 135–138.
- Mahoney AB, Sacks DL, Saraiva E, Modi G, Turco SJ 1999. Intra-species and stage-specific polymorphisms in LPG control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. *Biochemistry*; 38: 9813–9823.
- McConville MJ, Ferguson MA 1993. The Structure, Biosynthesis and Function of Glycosylated Phosphatidylinositols in the Parasitic Protozoa and Higher Eukaryotes. *J Biochem*; 294: 305–324.
- McConville MJ, Homans SW, Thomas-Oates JE, Dell A, Bacic A 1990. Structures of the Glycoinositolphospholipids from *Leishmania major*. A Family of Novel Galactofuranose-containing Glycolipids. *J Biol Chem*; 265: 7385–7394.
- McConville MJ, Schnur LF, Jaffe C, Schneider P 1995. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem. J*; 310: 807–818.
- McConville MJ, Turco SJ, Ferguson MA, Sacks DL 1992. Developmental Modification of Lipophosphoglycan During the Differentiation of *Leishmania major* Promastigotes to an Infectious Stage. *Embo J* ;11: 3593–3600.
- Medina HSG 1946. Estudos sobre leishmaniose. I. Primeiros casos de leishmaniose espontânea observados em cobaias. *Braz Arch Biol Technol*; 1: 39–74.

- Melo MN, Williams P, Tafuri WL 2001. Influence of lysates of the salivary glands of *Lutzomyia longipalpis* on the development of a *Leishmania major*-like parasite in the skin of the golden hamster. *Ann Trop Med Parasitol*; 95: 59-68.
- Muniz J, Medina HS 1948. Leishmaniose tegumentar do cobaio (*Leishmania enriettii* n.sp). *Hospital*; 33: 7–25.
- Orlandi PA Jr, Turco SJ 1987. Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Biol Chem*; 262: 10384–10391.
- 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: 970–974.
- Piedrafita D, Proudfoot L, Nikolaev AV, Xu D, Sands W, Feng GJ, Thomas E, Brewer J, Ferguson MA, Alexander J, Liew FY 1999. Regulation of Macrophage IL-12 Synthesis by *Leishmania* Phosphoglycans. *Eur J Immunol*; 29: 235–344.
- Proudfoot L, Nikolaev AV, Feng GJ, Wei WQ, Ferguson MA, Brimacombe JS, Liew FY 1996. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 93: 10984–10989.
- Proudfoot L, O'Donnell CA, Liew FY 1995. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol*; 25: 745–750.
- Ross R 1903. Note on the bodies recently described by Leishman Donovan. *Br Med J* 14: 1261 – 1262.
- Sacks D, Kamhawi S 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*; 55: 453–483.
- Sacks DL, Perkins PV 1984. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*; 223:1417–1419.
- 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. *J Exp Med*; 181: 685–697.
- Sádlová J 1999. The life history of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta Soc. Zool. Bohem.* 63: 331 – 366.

- Schneider P, Schnur LF, Jaffe CL, Ferguson MA, McConville MJ 1994. Glycoinositolphospholipid Profiles of Four Serotypically Distinct Old World *Leishmania* Strains. *Biochem J*; 304: 603–609.
- Schottelius J 1987. Selective lectin reactions of two stocks of *Leishmania enriettii* with differing pathogenicity. *J Parasitol Res*; 73: 1–8.
- Snapp EL, Landfear SM 1999. Characterization of a Targeting Motif for a Flagellar Membrane Protein in *Leishmania enriettii*. *J Biol Chem*; 274: 29543–29548.
- Snyderman R, Pike MC 1984. Chemoattractant receptors on phagocytic cells. *Annu. Rev. Immunol*; 2: 257–281.
- Soares RP, Barron T, McCoy-Simandle K, Svobodova M, Warburg A, Turco SJ 2004. *Leishmania tropica*: Intraspecific Polymorphisms in Lipophosphoglycan Correlate with Transmission by Different Phlebotomus Species. *Exp Parasitol* 107: 105–114.
- Soares RP, Cardoso TL, Barron T, Araújo MS, Pimenta PF, Turco SJ 2005. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *Int J Parasitol*; 35: 245–253.
- 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 sandfly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Mol. Biochem. Parasitol*; 121: 213–224.
- Teixeira MJ, de Almeida YM, Viana JR, Holanda Filha JG, Rodrigues TP, Prata JR Jr, Coêlho IC, Rao VS, Pompeu MM 2011. In vitro and in vivo activity of meglumine antimoniate produced at Farmanguinhos-Fiocruz, Brazil, against *Leishmania (Leishmania)amazonensis*, *L (L.) chagasi* and *L (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 103: 358–362.
- Theodos CM, Ribeiro JM, Titus RG 1991. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania infection* in mice. *Infect. Immun.* 59: 1592 – 1598.
- Thomaz-Soccol VF, Pratlong F, Langue R, Castro E, Luz E, Dedet JP 1996. New isolation of *Leishmania enrietti* Muniz and Medina, 1948 in Parana State Brazil, 50 years after the first description, and isoenzymatic polymorphism of the *L. enrietti* taxon. *Ann. Trop. Med. Parasitol*; 90: 491–495.
- Titus RG, Ribeiro JM 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science*; 239: 1306–1308.

- Tobin JF, Wirths DF 1992. A Sequence Insertion Targeting Vector for *Leishmania enriettii*. J Biol Chem; 267: 4752–4758.
- Tuon FF, Amato VS, Bacha HA, Almusawi T, Duarte MI, Amato Neto V 2008. Toll like receptors and leishmaniasis, Infect. Immun. 76 : 866–872.
- Turco SJ, Descoteaux A 1992. The Lipophosphoglycan of *Leishmania* Parasites. Annu Rev Microbiol; 46: 65–94.
- Turco SJ, Sacks DL 2003. Control of *Leishmania*-sand fly interactions by polymorphisms in lipophosphoglycan structure. Meth. Enzymol; 363: 377–381.
- Vargas-Inchaustegui DA, Tai W, Xin L, Hogg AE, Corry DB, Soong L 2009. Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice. Infect Immun. 77: 2948–2956.
- Vivarini Ade C, Pereira Rde M, Teixeira KL, Calegari-Silva TC, Bellio M, Laurenti MD, Corbett CE, Gomes CM, Soares RP, Silva AM, Silveira FT, Lopes UG 2011. Human Cutaneous Leishmaniasis: Interferon- dependent expression of Double-stranded RNA-dependent Protein Kinase (PKR) via TLR2. Faseb J; 25: 4162–4173.
- Volf P, Tesarová P, Nohýnkova EN 2000. Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. Med. Vet. Entomol. 14: 251–256.
- Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY 1995. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase, Nature. 375: 408–411.
- Wilhelm P, Ritter U, Labbow S, Donhauser N, Röllinghoff M, Bogdan C, Körner H 2001. Rapidly Fatal Leishmaniasis in Resistant C57BL/6 Mice Lacking TNF. J Immunol; 166: 4012–4019.
- Wong ILK, Chan KF, Burkett BA, Zhao Y, Chai Y, Sun H, Chan TH, Chow LM 2007. Flavonoid dimers as bivalent modulators for pentamidine and sodium stibogluconate resistance in *Leishmania*. J Antimicrob Chemother; 51: 930–940.
- Wong ILK, Chow LMC 2006. The role of *Leishmania enriettii* multidrug resistance protein 1 (LeMDR1) in mediating drug resistance is iron-dependent. Mol. Biochem. Parasitol; 150: 278–287.
- World Health Organization 2002. The World Health Report 192–197 [online - see Related Links]

World Health Organization 2002. Weekly Epidemiological Record. 77, 365–370 [online
- see Related Links]

Young DG, Duncan MA 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in the Mexico, the West Indies, Central and the South America (Diptera:Psychodidae). Memoirs of the American entomological institute, 54: 1–881.

Zawadzki J, Scholz C, Currie G, Coombs GH, McConville MJ 1998. The Glycoinositolphospholipids from *Leishmania Panamensis* Contain Unusual Glycan and Lipid Moieties. J Mol Biol; 2: 287–299.