

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

O impacto de cepas de *Leishmania braziliensis* isoladas de hospedeiros com diferentes formas clínicas na interação com macrófagos murinos

por

Tamara da Silva Vieira

Belo Horizonte

2018

DISSERTAÇÃO

MCS – IRR

T. S. VIEIRA

2018

TAMARA DA SILVA VIEIRA

O impacto de cepas de *Leishmania braziliensis* isoladas de hospedeiros com diferentes formas clínicas na interação com macrófagos murinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde – Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática

Orientação: Rodrigo Pedro Pinto Soares

Coorientação: Célia Maria Ferreira Gontijo

Belo Horizonte

2018

Catálogo-na-fonte

Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ

Biblioteca do IRR

CRB/6 1975

V586i
2018

Vieira, Tamara da Silva.

O impacto de cepas de *Leishmania braziliensis* isoladas de hospedeiros com diferentes formas clínicas na interação com macrófagos murinos / Tamara da Silva Vieira. – Belo Horizonte, 2018.

xiii, 67f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 53 - 67

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

1. *Leishmania braziliensis*/parasitologia 2. *Leishmania braziliensis*/ isolamento e purificação 3. Biogênese I Título. II. Soares, Rodrigo Pedro Pinto (Orientação). III. Gontijo, Célia Maria (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616 6.936

Tamara da Silva Vieira

O impacto de cepas de *Leishmania braziliensis* isoladas de hospedeiros com diferentes formas clínicas na interação com macrófagos murinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial o título de Mestre em Ciências da saúde Área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática

Banca examinadora

Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares (IRR/FIOCRUZ) Orientador/Presidente

Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo (IRR/FIOCRUZ) Coorientadora

Dra. Cristiana Toscano Fonseca (IRR/FIOCRUZ) Titular

Dr. Luis Carlos Crocco Afonso (UFMG) Titular

Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal (IRR/FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida em Belo Horizonte, 28/03/2018

Dedico este trabalho a minha mamãe Cida, minha maior incentivadora. Aquela que sempre se doou para a minha felicidade e me incentivou a trilhar novos caminhos.

“Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos que as grandes proezas da história foram conquistadas daquilo que parecia impossível.”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, por ter me concedido o dom da vida e ter fi de mim um ser humano perfeito, com saúde e uma família maravilhosa. Foi esse amor que veio pela fé que me mostrou o quanto nós somos capazes e que nunca me deixou fraquejar, mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada meu Deus.

A minha mãe realizadora de todo esse sonho, sem o seu amparo essa conquista jamais seria possível. Obrigada por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava, obrigada por todas as vezes que você perdeu o sono pelos meus problemas, obrigada por esse amor imensurável que me fez acreditar na vitória. Obrigada por toda a ajuda psicológica, fraternal e financeira. Essa conquista é para a senhora, que mesmo cansada se fez firme para me dar o amparo que precisava. Te amo.

A minha mamãe com açúcar, vovó Tereza, minha outra incentivadora. Aquela que também me ensinou o caminho da fé, que abriu mão de sua vida pelos seus netos. Obrigada por ter abdicado de sua vida para me alfabetizar, me educar e me amar. Obrigada por todo esse amor de mãe que me foi dado durante toda a vida, essa conquista também é para a senhora que sempre me incentivou a ir em busca do conhecimento.

A minha irmã Tamires, que mesmo sendo doce como um limão, sempre soube me dizer as palavras certas, muitas não tão doces mas que hoje entendo que foi para o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada pelos ensinamentos diários e pelo incentivo.

Ao meu papai do coração Marcelo por toda a paciência e dedicação como pai. Pelos ensinamentos, pelo carinho e amor dado durante todos esses anos. Obrigada por também me fazer acreditar no meu potencial e me mostrar sempre o caminho do conhecimento. Todo esse caminho percorrido só foi possível devido ao seu amparo.

Aos meus tios Romildo e Carlos que também foram pais e que sempre me ensinaram que é preciso muita garra para vencer os obstáculos na vida. À minha tia Nivia meu maior exemplo de educadora. Tia obrigada por todos os ensinamentos, pelas palavras de incentivo, pelo apoio incondicional em minha vida em todos os aspectos acadêmicos. Você sempre foi e sempre será uma grande incentivadora disso tudo, muito obrigada. A tia Jana por todo o amor e pelas eternas risadas dadas juntas. Aos meus anjos Aline, Rodrigo, Kauana e Cauã, vocês são as minhas alegrias, obrigada por me ensinarem o lado mais bonito da vida, esse amor que nos une sempre me deu um incentivo único para vencer. E a toda a minha família que sempre

me apoiou e me deu todo o amparo mesmo de longe. Essa conquista também é para todos vocês.

Aos meus amigos Paulo, Thais, Talita e Carla por todos os ensinamentos prestados na época da graduação. Pelas exageradas doses de diversão e afeto. Morro de orgulho da nossa amizade que foi além das barreiras acadêmicas, obrigada por serem essa amizade invejável e confortante. E a toda a galera da bio que mesmo as vezes um pouco distante sempre se fizeram presente.

As minhas amigas Ariane, Deborah, Binha, Thássia, Lorraine, Thais Dias, Mayana e Nathalia, obrigada por todas as palavras de incentivo e por todos os maravilhosos momentos compartilhados juntas.

A Dra. Patrícia Quaresma por todos os ensinamentos, pela oportunidade que me foi dada que me colocou nos trilhos da vida acadêmica. Aos meus professores Igor Rismo e Cláudia Penaforte que foram grandes influenciadores na graduação e me deram a base do conhecimento na biologia.

A Dra. Célia Maria por ter aberto as portas da Fiocruz e do conhecimento. Obrigada por ter acreditado no meu potencial, obrigada pelo incentivo acadêmico, profissional e pessoal. E por estar sempre disposta a ensinar.

A Ana Cristina (Tina) pelos ensinamentos com cultura, pelos conhecimentos básicos com *Leishmania* e pelo convívio de afeto imensurável durante os anos que dividimos juntas o mesmo ambiente de trabalho. E a todos os colegas do Lalei com os quais tive a oportunidade de aprender muito.

As meninas do Mais Lalei (Agnes, Lara, Fabi Lara, Josie, Erika, Fabiana Paixão, Maiara, Rosana, Andreza, Jucelia e Raquel) eternas em meu coração, obrigada por todas as incontáveis tardes de risadas, por todos os ensinamentos e encorajamentos, a vocês minhas eternas palavras de gratidão.

Ao meu orientador Dr. Rodrigo Soares, obrigada por esse convívio impar durante esses anos, obrigada por todo o conhecimento que me foi passado, pela confiança e pelas eternas palavras de incentivo. A você maior responsável por essa obra o meu muito obrigada, foi um verdadeiro prazer trabalhar ao seu lado. Poder compartilhar do seu conhecimento e do seu potencial foi um verdadeiro privilégio. Me sinto honrada e serei eternamente grata por ter sido sua aluna, em você descobri que um convívio saudável com o orientador nos torna muito mais felizes e satisfeitos com o que fazemos. Descobrir em um chefe um amigo é um

privilegio para poucos, sinto que se pudesse escolheria você como orientador mais um milhão de vezes apenas para poder ser grata por todo o conhecimento e confiança que me foi passado. Rod, muito obrigada por tudo. Espero um dia ser um terço do o que você é como profissional.

Ao Dr. Rubens Lima do Monte por todo o conhecimento passado, pela paciência e pelas dúvidas sanadas. Obrigada por ter sido o pivô de um grande sonho e por ter também acreditado no meu potencial. Serei uma eterna admiradora do seu excelente trabalho como educador e pesquisador. Obrigada por todo o incentivo e por todas as vezes que você abdicou do seu tempo para me ensinar algo. Obrigada por nunca nos fazer perder a curiosidade pelo conhecimento e por ensinar sempre o caminho da busca pelo conhecimento.

A Agna e Larissa, pela amizade, paciência, por me ouvirem e pelos ensinamentos divididos durante esses anos. Vocês foram essenciais para o meu caminho até aqui, a amizade de vocês me mostrou o quão importante e gratificante é a amizade no ambiente de trabalho. Aquelas que levarei para a vida, muito obrigada meninas.

A Dr. Paula Monalisa por todo o conhecimento compartilhado, por todos os ensinamentos em glicobiologia e imunologia, por todas as dúvidas sanadas e pela amizade.

Ao Jeronimo Rugani, talvez uma das peças mais importantes para a realização desse trabalho. Obrigada por nunca ter medido esforços para me ajudar, me ensinar e dividir comigo todas as angústias e inseguranças de um mestrado. Poucas vezes na vida encontramos alguém tão presente além do trabalho. Obrigada por todas as vezes que compartilhamos juntos o conhecimento, obrigada por ter aberto mão de suas dúvidas para sanar as minhas. Tenho eterna gratidão por todos os ensinamentos que tive o prazer de aprender com você. Obrigada por ter tornado do meu mestrado mais leve e por sempre ter me amparado nos momentos de desespero.

Aos amigos feitos no laboratório de parasitologia: Maísa, Renata, Nayara, Edneia Chris, Luiza e Policarpo, com vocês tive o prazer de dividir boas risadas e um conhecimento inigualável, obrigada por estarem sempre dispostos a me ouvir e por compartilharem do conhecimento.

Ao Dr. Albert Descoteaux, o meu muito obrigada pela honra de dividir um projeto. Ir para o Canadá foi uma oportunidade ímpar que me tornou uma outra pessoa como profissional, aprendi muito e espero contribuir grandemente para a pesquisa. Obrigada pela confiança depositada e por todo o conhecimento passado. Ter a chance de trabalhar com um pesquisador renomado em um laboratório de altíssima qualidade me fez realizada

profissionalmente. Um intercambio é muito mais que um ganho profissional é também um aprendizado pessoal, obrigada por fazer disso um processo completo.

Aos eternos colegas (Guilherme, Hamlet, Renaud, Roman, Christine, Kevin Ory, Kevin Otis e Olivier) do Institut Armand-Frappier no Canadá, muito obrigada por todos os ensinamentos passados, pela paciência, pelo convívio diário que foi essencial para o meu crescimento e por todos os momentos de diversão divididos juntos.

E por último, mas não menos importante ao Kévin Ory por todo o conhecimento compartilhado, por todos os ensinamentos básicos, pelo companhia durante esses meses. Por ter sido muito mais que apenas um companheiro de trabalho, mas sim alguém que pude compartilhar as alegrias e tristezas vividas em outro país e com quem ainda posso contar em todos os momentos. Obrigada.

RESUMO

Leishmania (Viannia) braziliensis é o agente etiológico da leishmaniose tegumentar americana (LTA) podendo causar diferentes formas clínicas: leishmaniose cutânea (CL), muco-cutânea (LMC) e lesões atípicas (LAT). Estas últimas podem apresentar-se como pápulas, placas, nódulos verrucosos, lesões vegetativas e/ou lupóides. Nossa hipótese de trabalho seria quais os fatores responsáveis por estas diferentes manifestações clínicas dentro desta espécie. Foram avaliados diferentes parâmetros relacionados à infectividade do parasito: 1) papel do lipofosfoglicano (LPG) na interação com macrófagos peritoneais; 2) avaliação dos parasitos na biogênese de fagossomos em macrófagos medulares (BMMs); 3) avaliação e quantificação da expressão de LPG e GP63 na superfície dos parasitos e, 4) caracterização preliminar de LPGs purificados destes parasitos. Utilizamos seis cepas/isolados de *L. braziliensis*: M2903, RR051 e RR418 (lesões típicas), RR410 (atípica), M15991 (muco-cutânea) e M8401 (cepa isolada de vetor). LPGs das diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis* foram extraídos e purificados. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e respectivos knock-outs (TLR2 -/- e TLR4 -/-) foram estimulados por estes LPGs para a produção de óxido nítrico (NO) e citocinas. Os LPGs, dependendo da forma clínica da cepa de que foram purificados, ativaram diferencialmente a produção de NO e citocinas (TNF- α , IL-6, IL-12) via TLR4. Não houve produção de IL-1 β . No próximo passo, incubamos os mesmos LPGs em presença de zimozan. Os LPGs aderidos ao zimozan foram incubados com BMMs para a avaliação do marcador de biogênese LAMP1 (recrutamento e fagocitose). Não foi observada diferenças na biogênese de fagossomos de BMMs incubados com zimozan e LPGs das diferentes cepas/isolados. Posteriormente, os parasitos foram opsonizados e incubados em presença dos BMMs para a avaliação infecção. A cepa RR410 (atípica) apresentou um índice de infectividade menor quando comparada às outras cepas. Estes mesmos experimentos foram realizados na presença de LAMP1 e *Lysotracker* (fagocitose e acidificação). Os parasitos induziram diferenças na biogênese de fagossomos dependendo da cepa/isolado. Por exemplo, a cepa atípica (RR410) foi menos fagocitada que as outras, enquanto a cepa M15991 (muco-cutânea) acidificou menos o fagolissomo. Para a avaliação da expressão de LPG e GP63, foi observado em comparação aos controles (*Leishmania donovani* e *Leishmania major*) que ambos glicoconjugados estavam menos expressos na superfície de *L. braziliensis*. Nossos resultados demonstraram que diferentes isolados de *L. braziliensis* de diferentes formas clínicas e hospedeiros podem induzir diferentes respostas em células do hospedeiro vertebrado. Este efeito se deu principalmente, na fagocitose, produção de NO e citocinas, desfechos na biogênese dos fagossomos e expressão de glicoconjugados (LPG e GP63). A caracterização preliminar das unidades repetitivas do LPG detectou polimorfismos que podem justificar os diferentes padrões de ativação em macrófagos peritoneais e de infecção com os parasitos inteiros.

PALAVRAS- CHAVE: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, interação parasito-hospedeiro; Lipofosfoglicano, GP63; biogênese,

ABSTRACT

Leishmania (Viannia) braziliensis is the etiologic agent of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) displaying different clinical forms: cutaneous leishmaniasis (CL), mucocutaneous (MCL) and atypical lesions (LAT). LAT may be presented as papules, plaques, verrucous nodules, vegetative and/or lupoid lesions. In our hypothesis we are testing the possible factors responsible for those different clinical manifestations within this species. Different parameters related to infectivity of the parasite were evaluated: 1) role of lipophosphoglycan (LPG) in the interaction with peritoneal macrophages; 2) evaluation of parasites in the biogenesis of phagosomes in medullary macrophages (BMMs); 3) evaluation and quantification of LPG and GP63 expression on the surface of the parasites and, 4) preliminary characterization of purified LPGs of these parasites. We used six isolates of *L. braziliensis*: M2903, RR051 and RR418 (typical lesions), RR410 (atypical), M15991 (mucocutaneous) and M8401 (isolated vector strain). LPGs from the different isolates of *L. braziliensis* were extracted and purified. Peritoneal macrophages of C57BL/6 mice and their knock outs (TLR2 $-/-$ and TLR4 $-/-$) were stimulated by these LPGs for the production of nitric oxide (NO) and cytokines. LPGs, depending on the clinical form of the strain from which they were purified, differentially activated the production of NO and cytokines (TNF- α , IL-6, IL-12) via TLR4. There was no production of IL-1 β next step, we incubated the same LPGs in the presence of zymosan. LPGs adhered to zymosan were incubated with BMMs for evaluation of the LAMP1 biogenesis marker (recruitment and phagocytosis). No differences were observed in phagosome biogenesis of BMMs incubated with zymosan and LPGs of the different strains/isolates. Subsequently, the parasites were opsonized and incubated in the presence of BMMs for infection evaluation. The RR410 (atypical) strain had a lower infectivity index when compared to the other strains. These same experiments were performed in the presence of LAMP1 and Lysotracker (phagocytosis and acidification). The parasites induced differences in the biogenesis of phagosomes depending on the strain/isolate. For example, the atypical strain (RR410) was less phagocytosed than the others, whereas strain M15991 (muco-cutaneous) less acidified the phagolissome. For the evaluation of LPG and GP63 expression, it was observed in comparison to controls (*Leishmania donovani* and *Leishmania major*) that both glycoconjugates were less expressed on the surface of *L. braziliensis*. Our results demonstrated that different isolates of *L. braziliensis* from different clinical and host forms can induce different responses in cells of the vertebrate host. This effect was mainly due to phagocytosis, NO and cytokine production, phagosome biogenesis and glycoconjugate expression (LPG and GP63). The preliminary characterization of LPG repetitive units detected polymorphisms that may justify different patterns of activation in peritoneal macrophages and infection with whole parasites.

KEYWORDS: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, host-parasite interaction; Lipophosphoglycan, GP63; biogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura bioquímica básica da molécula LPG.....	17
Quadro 1: Cepas/isolados de <i>L. braziliensis</i> de acordo com origem, tipo de lesão e perfil genético.....	24
Figura 2: Perfil genético de diferentes cepas/isolados de <i>L. braziliensis</i> utilizando o gene <i>hsp70</i>	32
Figura 3: Reatividade dos LPGs purificados (10 µg) das cepas/isolados de <i>L. braziliensis</i> (M2903, RR051, RR418, RR410, M15991 e M8401) em presença do anticorpo CA7AE (1:1000).....	33
Figura 4: Produção de óxido nítrico (NO) e citocinas (IL-6, IL-12 e TNF-α) por macrófagos murinos estimulados por LPGs (10 µg/mL) de diferentes cepas/isolados de <i>L. braziliensis</i>	34
Figura 5: Cromatografia em camada fina de unidades repetitivas marcadas com [6- ³ H] galactose de LPGs de diferentes cepas/isolados de <i>L. braziliensis</i>	36
Figura 6: Índice de infectividade (%) de diferentes cepas/isolados de <i>L. braziliensis</i> após duas horas de infecção.....	37
Figura 7: Efeito do zimosan + LPG de diferentes cepas/isolados de <i>L. braziliensis</i> no recrutamento de LAMP-1 após 10 minutos (A) e duas horas (B) de fagocitose.....	38
Figura 8: Recrutamento de LAMP-1 nos fagossomos de células infectadas com partículas de zimosan cobertas com LPGs purificados de diferentes cepas/isolados de <i>L. braziliensis</i> a em diferentes tempos de fagocitose 10 minutos (barras brancas) e 2 horas (barras cinzas).....	39
Figura 9: Efeito dos parasitos de diferentes cepas/isolados de <i>L. braziliensis</i> no recrutamento de LAMP-1 após 2 (A) e 24 horas (B) de fagocitose.....	40
Figura 10: Recrutamento de LAMP-1 nos fagossomos de células infectadas com parasitos de diferentes cepas/isolados de <i>L. braziliensis</i> em diferentes tempos de fagocitose (2 h, barras brancas) e 24 horas (barras cinzas).....	41
Figura 11: Efeito dos parasitos de diferentes cepas/isolados de <i>L. braziliensis</i> mostrando a acidificação pelo <i>Lysotracker</i> após 2 (A) e 24 horas (B) de fagocitose.....	42

Figura 12: Acidificação em fagossomos infectados com diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis* em diferentes tempos de fagocitose (2 h, barras brancas) e 24 horas (barras cinzas).....43

Figura 13: Expressão de LPG (A), GP63 (B) e atividade proteolítica (C) de diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis*.....45

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	6
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Leishmanioses.....	16
1.2. <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	16
1.3. Interação parasito hospedeiro.....	17
1.4. Lipofosfoglicano (LPG) e a Glicoproteína de superfície (GP63)	18
1.5. Mecanismos da resposta imune em <i>Leishmania</i>	20
1.6. Biogênese dos fagossomos	22
JUSTIFICATIVA.....	24
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Objetivo geral.....	24
3.2. Objetivos específicos.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. Cepas de <i>Leishmania</i> e condições de cultivo.....	25
3.2. Extração de DNA das promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	26
3.3. Extração e purificação de LPG.....	26
3.4. Dot blot.....	27
3.5. Western Blot.....	27
3.6. Obtenção de macrófagos peritoneais.....	28
3.7. Determinação dos níveis de citocinas e óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos.....	28
3.8. Macrófagos e sincronização de fagocitoses.....	29
4.8.1. Cobertura e opsonização de partículas.....	29
4.8.2. Imunofluorescência e microscopia confocal.....	30
4.8.3. Acidificação dos fagossomos.....	31
4.9. Marcação metabólica do LPG.....	31

4.10. Despolimerização do LPG e caracterização preliminar das unidades repetitivas.....	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1. PCR-RFLP do hsp70.....	33
4.2. Dot Blot.....	34
4.3. Perfil de produção de citocinas e óxido nítrico (NO).....	35
4.4. Cromatografia em camada fina das unidades repetitivas dos LPGs.....	36
4.5. Infectividade em macrófagos derivados da medula óssea.....	38
4.6. Recrutamento de LAMP-1 em partículas de zimosan cobertos com LPG	38
4.7. Recrutamento de LAMP-1 nos fagossomos de macrófagos infectados com promastigotas de diferentes cepas/isolados de <i>L. braziliensis</i>	40
4.8. Acidificação nos fagossomos de macrófagos infectados com cepas/isolados de <i>L. braziliensis</i>	42
4.9. Expressão diferencial de glicoconjugados (LPG e GP63).....	44
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÕES.....	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1. Introdução

1.1 Leishmanioses

As Leishmanioses são causadas por parasitos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Inicialmente, incluía os subgêneros *Leishmania* Lainson & Shaw 1987, *Viannia* Safjanova 1982 e *Sauroleishmania* (Safjanova 1982) de acordo com sua distribuição no trato digestivo do vetor (Lainson and Shaw, 1987). As espécies do subgênero *Viannia* apresentam desenvolvimento inicial no intestino posterior do flebotomíneo, aderidos na região do piloro, e são encontrados unicamente no Novo Mundo. As espécies do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se no intestino médio e anterior dos flebotomíneos, e seus exemplares são encontrados no Novo e no Velho Mundo (revisado por (De Assis et al., 2012). As espécies do subgênero *Sauroleishmania* envolvem principalmente parasitos de lagartos e aranhas. Mais recentemente, o gênero *Leishmania* foi reclassificado em duas revisões importantes. Atualmente, existem quatro subgêneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* e o recém descrito *Mundinia* (Akhoundi et al., 2016; Espinosa et al., 2016) que envolviam parasitos primeiramente classificados no “complexo *L. enriettii*” (Paranaíba et al., 2017a, 2017b). Esses protozoários são digenéticos podendo ser encontrados em roedores, marsupiais, cães e humanos (Grimaldi et al., 1989; Kaye and Scott, 2011). 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 and Duncan, 1994). A transmissão ocorre através da picada de fêmeas durante o repasto sanguíneo. Após a inoculação das formas metacíclicas, dependendo da espécie, *Leishmania* pode causar formas viscerais ou cutâneas, com possível acometimento da mucosa. Neste trabalho focaremos na espécie *Leishmania braziliensis*, espécie dermatrópica, capaz de causar diferentes manifestações clínicas dentro do espectro da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).

1.2 *Leishmania (Viannia) braziliensis*

No Brasil, a LTA causada por *L. braziliensis* pode apresentar algumas variedades de formas clínicas: leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e lesões atípicas (LAT). A LC é a forma mais comum e podendo ser única no sítio da picada ou metastatizar para a mucosa oronasofaríngea levando a lesões graves e desfigurantes (LMC). A LC é geralmente

indolor em áreas expostas da pele com formato arredondado ou ovalado, bordas bem delimitadas, fundo avermelhado e granulações. Recentemente as publicações tem descrito a ocorrência de lesões atípicas causadas por *L. braziliensis*. Essas lesões podem se confundir com outras etiologias (micoses, Hanseníase e carcinomas) e podem se apresentar como pápulas, placas, nódulos verrucosos, lesões vegetativas e lupóides (Guimarães et al., 2009; Quaresma et al., 2018). Essas lesões atípicas já foram anteriormente caracterizadas histologicamente e apresentaram características similares as de lesões típicas causadas por *Leishmania braziliensis* (Guimarães et al., 2009; Meireles et al., 2017). Estas características envolvem principalmente a presença de um infiltrado inflamatório intenso com presença de vários tipos celulares incluindo macrófagos, linfócitos com ou sem necrose (Guimarães et al., 2009). Os fenômenos que levam ao aparecimento de lesões atípicas ainda são pouco conhecidos e os trabalhos nesta área ainda são escassos. Acredita-se que possam estar associados à resposta imune do hospedeiro, a cepa do parasita parasita e aos vetores (Costa-Silva et al., 2014; Guimarães et al., 2016a, 2009; Quaresma et al., 2018). Nesta dissertação, exploramos alguns parâmetros em cepas/isolados de diferentes manifestações clínicas afim de compreender alguns destes mecanismos de virulência.

1.3 Interação parasito-hospedeiro

Após sua inoculação no hospedeiro vertebrado, a *Leishmania* precisa enfrentar condições extremamente adversas. Para isso, desenvolveram moléculas em sua superfície denominadas glicoconjugados, importantes no estabelecimento da infecção (De Assis et al., 2012; Sacks e Kamhawi, 2001). Um glicoconjugado é qualquer molécula que possui algum motivo de carboidrato ligado covalentemente a outra classe de moléculas, como lipídeos e/ou proteínas. Estes incluem os lipofosfoglicanos (LPGs), glicoinositolfosfolípides (GILPs) e as proteases de superfície (GP63) que estão ancorados a superfície do parasito por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Além disso, os glicoconjugados podem ser secretados sob a forma de fosfatases ácidas (sAPs), fosfoglicanos (PGs) e proteofosfoglicanos (PPGs) (Assis et al., 2012). É importante salientar que, após a inoculação das formas promastigotas metacíclicas pelo vetor, vários tipos celulares como macrófagos e neutrófilos são atraídos para o sítio da picada (Nathan C. Peters and Sacks, 2009; Sindrilaru et al., 2011). Dentro destas células, os parasitos modulam várias vias intracelulares para sua sobrevivência e alguns destes mecanismos envolvem o LPG e GP63. Nesta dissertação, exploraremos o comportamento

destes glicoconjugados em diferentes cepas/isolados e seu papel na biogênese de fagossomos. Vale ressaltar, que um grande número de trabalhos explorou a interação de *Leishmania* com espécies do Velho Mundo (*Leishmania major/Leishmania donovani*) em macrófagos murinos (Mosser and Rosenthal, 1993; Murray et al., 2014) e que este trabalho envolverá uma espécie do Novo Mundo.

1.4 O Lipoposfoglicano (LPG) e a Glicoproteína (GP63)

O LPG é o glicoconjugado mais estudado em *Leishmania* sendo encontrado nas formas promastigotas. Ele está localizado em toda superfície do parasito, incluindo o flagelo. A molécula de LPG possui quatro domínios: 1) uma âncora lipídica de 1-O-alkil-2-liso-fosfatidilinositol seguido por 2) uma parte central (“core”) formada por um heptassacarídeo Gal(α 1,6)Gal(α 1,3)Gal(β 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(β 1,4)Man(α 1)-PO₄ e um pequeno oligossacarídeo neutro terminal formando uma estrutura do tipo “cap” (Figura 1) (Turco and Descoteaux, 1992).

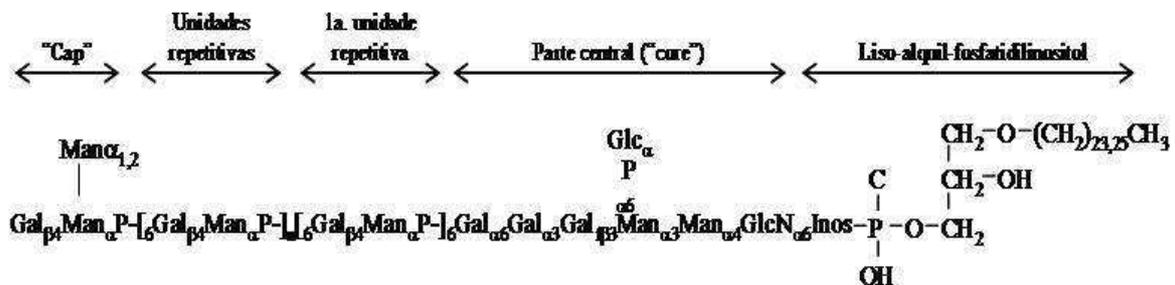


Figura 1: Estrutura bioquímica básica da molécula LPG. Gal = Galactose, Gal_f = Galactofuranose, Man = Manose, Glc = glicose, GlcN = N-acetil glicosamina e Inos = Inositol adaptado de (Descoteaux and Turco, 1999).

No hospedeiro vertebrado, LPGs de diferentes espécies de *Leishmania* podem atuar em vários tipos celulares conferindo resistência ao sistema do complemento, inibindo o processo de maturação dos fagossomos, inibindo a proteína quinase C, modulando a produção de NO e citocinas, modulando MAPKs e NF-κB, sendo um agonista de TLR2/TLR4, induzindo redes extracelulares de neutrófilos (NETs), induzindo a proteína quinase R, induzindo heme-oxigenase I, induzindo leucotrieno B4 e PPA (Assis et al., 2012;

de Carvalho Vivarini et al., 2011; Ibraim et al., 2013; Lima et al., 2017a; Luz et al., 2012; Ng Yan Hing et al., 2004; Nogueira et al., 2016; Paranaíba et al., 2015; Spath et al., 2003; Tavares et al., 2014; Vinet et al., 2009; Winberg et al., 2009). Para *L. braziliensis*, é sabido que o LPG ativa TLR2/TLR4, induz a produção de NO, IL-6, TNF- α e IL-1 β e transloca NF- κ B. Já os GIPLs desta espécie ativam preferencialmente TLR4 (Ibraim et al., 2013). São moléculas capazes de induzir NO e TNF- α e inibir a produção de MAPKs (Assis et al., 2012). Entretanto, estes trabalhos utilizaram a cepa de referência M2903 de *L. braziliensis*, e portanto não sabemos se utilizando outras cepas/isolados de diferentes formas clínicas como estes processos seriam afetados.

Os estudos com variações intraespecíficas em LPGs de cepas do Novo Mundo são escassos. Foi demonstrado que existem polimorfismos nas unidades repetitivas do LPG de *L. infantum* (Coelho-Finamore et al., 2011), *L. enriettii* (Paranaíba et al., 2015) e *L. amazonensis* (Nogueira et al., 2017). No caso de *L. infantum*, esta espécie apresentou três tipos de LPGs (I, II e III) com unidades repetitivas contendo diferentes cadeias laterais de glicose. Os LPGs do tipo II e III induziram uma maior produção de NO do que os do tipo I em macrófagos murinos. Paranaíba et al., 2015 demonstraram que os LPGs de *L. enriettii* são desprovidas de cadeias laterais mas diferem em relação ao tamanho do LPG, sendo capazes de induzir a produção de NO e outras citocinas por macrófagos murinos. Finalmente, em *L. amazonensis*, um polimorfismo marcante foi observado nas cepas PH8 e Josefa. A primeira possui um LPG com cadeias laterais de glicose enquanto a segunda possui cadeias laterais de galactose (Nogueira et al., 2017). Nesta dissertação exploraremos pela primeira vez a ocorrência de polimorfismos intra-específicos no LPG de *L. braziliensis*.

A GP63 é uma glicoproteína de aproximadamente 63 kilodaltons (kDa) e assim como o LPG ela também é uma molécula de superfície muito importante como fator de virulência no hospedeiro vertebrado (d'Avila-Levy et al., 2014; Olivier et al., 2012). Ela é uma metalopeptidase dependente de zinco, também conhecida como leishmanolisina, cuja massa molecular varia de 58 a 65 kDa. Ela é capaz de alterar a expressão de receptores de superfície em células NK inibindo assim sua proliferação (Lieke et al., 2008). Nos linfócitos T, ela cliva o co-receptor de superfície CD4 reduzindo a resposta das células apresentadoras de antígeno, modula a expressão e secreção de citocinas e inativa fatores de transcrição como NF- κ B (Séguin and Descoteaux, 2016). Durante fagocitose, a GP63 é liberado pelo parasita gerando acesso a vários compartimentos intracelulares onde ela cliva uma série de reguladores de

função de macrófagos incluindo aqueles de fusão de membrana (Álvarez de Celis et al., 2015; Isnard et al., 2012; Matheoud et al., 2013; Olivier et al., 2012). Além de induzir TNF e IL-6 em estudos *in vitro* e *in vivo* contribuindo para o aumento no infiltrado inflamatório de fagócitos para o local de inoculação no parasito (Arango et al., 2014). No hospedeiro vertebrado, a GP63 permite que as promastigotas de *Leishmania* inibam a montagem do complexo de NOX2, um complexo importante da biogênese de fagossomos, prejudicando a capacidade das células infectadas de processar antígenos para a apresentação cruzada e para ativação de células T ((Matheoud et al., 2013; Savina et al., 2006). Em *L. amazonensis*, já foi demonstrado o papel direto da GP63 na resistência à lise mediada pelo complemento. Já em *L. donovani* e *L. major* ela está envolvida na inibição da apresentação de antígenos.

Em *L. braziliensis*, já se sabe que esta espécie possui várias leishmanolisinas e que estas são codificadas pelo cromossomo 10 (Sutter et al., 2017). Este mesmo trabalho sugere que a plasticidade fenotípica das GP63 em *L. braziliensis* pode ser importante para a sua virulência. Outro trabalho mostrou que as GP63 de isolados da Bahia de diferentes formas clínicas possuíam polimorfismos mesmo dentro de uma mesma área endêmica (Medina et al., 2016). Porém, a análise funcional dos domínios que interagem com o hospedeiro vertebrado mostrou que os mesmos são conservados. Entretanto, em nossos isolados não sabemos se ocorrem variações na expressão ou na molécula de GP63.

1.5 Mecanismos da resposta imune em *Leishmania*

Nas células do sistema fagocitário mononuclear, especificamente macrófagos teciduais, os parasitos têm que sobreviver no ambiente ácido e hostil dos fagolisossomos. Lá eles se diferenciam em amastigotas, que são as formas intracelulares de divisão (Dejardins e Descoteaux, 1997). Os macrófagos são as células de defesa responsáveis pela resposta do tipo celular em *Leishmania*. Embora a fagocitose possa fornecer o estímulo inicial do antígeno, a atividade dos macrófagos pode ser aumentada por citocinas secretadas por células T auxiliares, sendo o interferon gama (IFN- γ) um dos mais potentes ativadores de macrófagos) (Mosser e Edwards, 2008). Além da fagocitose, os macrófagos desempenham um papel central na inflamação atuando tanto na resposta imune inata ou adaptativa. Moléculas de superfície como PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) são reconhecidos pelas células do sistema imune inato como um sinal de invasão por patógenos. Essas

moléculas são reconhecidas por receptores do tipo Toll (TLRs) que atuam vias intracelulares da resposta imune (Gazzinelli e Denkers, 2006; Trinchieri e Sher, 2007). Em *Leishmania* spp., o perfil de resposta também compreende imunidade adaptativa, portanto, na estimulação de linfócitos TCD4, IL-1, IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF- α para promover a ativação de macrófagos. No caso da estimulação Th2, as citocinas envolvidas são IL-4, IL-5 e IL-13, que inibem a ativação de macrófagos e contribuem para a sobrevivência dos protozoários (Gupta et al., 2013).

O papel de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α , bem como várias outras quimiocinas, foram induzidas em os estágios iniciais da infecção em camundongos por *L. donovani* e *L. major* (Matte e Descoteaux, 2010). Já o TLR9 está envolvido na ativação das células NK em modelo animal da leishmaniose visceral (*L. donovani*) e em leishmaniose cutânea (*L. major* e *L. braziliensis*). Já foi demonstrado também que em diferentes isolados de *L. amazonensis*, a produção de IFN- γ , IL-12, IL-10 e IL-4 é extremamente baixa, além disso essa espécie especificamente é conhecida por modular a resposta imune do hospedeiro, inibindo a resposta e produção de NO pelos macrófagos (Osorio y Fortéa et al., 2009; Souza et al., 2012). Em *L. infantum* as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α e IL-10 e IL-12 são produzidas em baixos níveis ou não foram produzidas, mas a produção de NO também é elevada (Ibraim et al., 2013). *L. braziliensis* além de regular a expressão de marcadores de ativação das células dendríticas induzindo a produção de IL-12 e TNF- α e de IL-10, TGF- β e IL-4 em lesões recentes (Carvalho et al., 2007; Costa-Silva et al., 2014; Vargas-Inchaustegui et al., 2009). De acordo com alguns autores, a produção das citocinas inflamatórias IFN- γ e TNF- α poderia promover controle da disseminação parasitária e resolução da infecção, no entanto uma resposta Tipo 1 exacerbada tem sido associada a maior dano tecidual (Bacellar et al., 2002; Carvalho et al., 2007; Díaz et al., 2003; Faria et al., 2005; Green et al., 1990; Horta et al., 2012). Entretanto, alguns fatores do parasito poderiam estar relacionados à imunopatologia. Em *Leishmania*, existem alguns PAMPs já descritos que contribuem para a virulência e patogenicidade como LPG e GP63. Eles são importantes na adesão, fagocitose e proteção contra os processos proteolíticos dos macrófagos. Porém, como os LPGs de *L. braziliensis* de várias formas clínicas/isolados vão ativar esta produção de citocinas e também os mecanismos de biogênese dos fagossomos é desconhecido.

1.6 Biogênese dos fagossomos

Dentro dos macrófagos, vários mecanismos são desencadeados pelo parasito para sua sobrevivência nos fagolisossomos (Aderem, 2003; Niedergang and Chavrier, 2004; Stuart and Ezekowitz, 2005). O processo de internalização começa com a estimulação de receptores fagocíticos levando a uma reorganização da membrana plasmática formando uma organela fechada, o fagosoma. Após a fusão com os lisossomos, o fagosoma amadurece em um fagolisossoma, levando à destruição das partículas ou patógenos interiorizados e a apresentação de antígenos derivados. Dependendo do alvo internalizado (microorganismos, corpos apoptóticos ou partículas opsonizadas), os receptores estimulados ativam diferentes cascatas de sinalização (Braun and Niedergang, 2006). Em *Leishmania*, os primeiros trabalhos realizados por Desjardins e Descoteaux, 1997 demonstraram a capacidade do parasito inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo, sendo este fenômeno dependente de LPG. Portanto, a interação do parasito com a célula gira em torno da maturação e função do compartimento fagossomal. Vários marcadores celulares, como a Proteína 1 associado a membrana do lisossomo (LAMP1) e LysoTracker, podem ser utilizados para detectar as mudanças no ambiente do lúmen fagossomal (Vinet et al., 2009). Estudos anteriores demonstravam a maturação do fagossomo como um conceito extremamente simples envolvendo sua fusão a lisossomos. Porém, agora sabe-se que os fagossomas são conhecidos por interagir com muitas organelas intracelulares durante seu processo de maturação. Mesmo antes dos fagossomas serem totalmente formados, proteínas, como as do complexo NADPH oxidase que gera a quebra do superóxido, podem ser observadas sendo montadas em associação (Lodge et al., 2006). Uma vez que fagossoma está fechado, o processo de maturação começa e eles tornam-se cada vez mais ácidos e hidroliticamente ativos funcionando como um sistema endossomal de reciclagem (incluindo a secreção de lisossomos), corpos multivesiculares como o compartimento MHC classe II e até o retículo endoplasmático (Desjardins and Griffiths, 2003; VIEIRA et al., 2002). Todas essas fontes de membrana e as proteínas podem afetar a função dos fagossomas. No entanto, essas interações são rotineiramente avaliadas simplesmente pela aquisição de proteínas como marcador de alterações nas atividades funcionais. Além disso, as formas promastigotas de *L. donovani* desativam as principais funções antimicrobianas inibindo a bioagênese do fagolisossomo (Arango Duque et al., 2013; Vinet et al., 2008). O LPG presente na superfície da *Leishmania* desempenha um papel importante nesta inibição, perturbando os microdomínios lipídicos

fagossomais (Czibener et al., 2006; Matheoud et al., 2013). Evidências indicam que a GP63 também contribui para esse remodelamento (Arango et al., 2013; Vinet, 2009). Assim, durante a fagocitose do parasita, a GP63 é liberada rapidamente e adquire acesso a vários compartimentos intracelulares, clivando uma série de reguladores da função dos macrófagos, incluindo aqueles de fusão de membrana (Arango et al., 2013; Vinet et al., 2009; Arango et al., 2004). Uma dessas moléculas é a proteína de membrana SNARE (proteína de ligação ao factor de N-etilmaleimida sensível à vesícula), que recentemente demonstrou controlar o recrutamento precoce de NADPH oxidase (NOX2) para os fagossomas em *L. donovani* (Arango et al., 2013). Portanto, uma consequência da desorganização do microdomínio mediado pelo LPG ou GP63 é a exclusão de Syt (synaptotagminas) V do fagossoma. Elas constituem uma família de proteínas de membrana sensíveis ao cálcio que controlam a fusão através de interações com SNARE e lipídios (Vinet et al., 2011). Além disso, já foi demonstrado também que GP63 é um fator de virulência envolvido na biogênese de fagossomas também em *L. mexicana* (Casgrain et al., 2016). Dependendo da espécie, a acidificação pode variar, em *L. major*, por exemplo, estudos mostraram que a acidificação do fagossoma em macrófagos infectados por esta espécie foi maior que em *L. donovani*. Porém, isso não afetou a sobrevivência do parasito (Spath et al., 2003). Esses fenômenos são ainda desconhecidos para *L. braziliensis*.

Com base no que foi exposto, a interação entre *Leishmania* e macrófagos é um fenômeno complexo que envolve desde mecanismos extracelulares de reconhecimento até eventos intracelulares em compartimentos nestas células. Diversos estudos já demonstraram a complexibilidade da biogênese nos fagossomos em *L. major*, *L. donovani*, *L. mexicana*, *L. amazonenses* (Arango Duque et al., 2013; Courret et al., 2002; Descoteaux and Turco, 2002; Desjardins and Descoteaux, 1997; Ilg et al., 1996; Spath et al., 2003; Vinet et al., 2009, 2008). Entretanto em relação à biogênese, poucas informações acerca de *L. braziliensis* estão disponíveis principalmente em cepas/isolados de diferentes hospedeiros e manifestações clínicas. Pretendemos trazer informações adicionais de como estes parasitos exercem seu papel de virulência e interação com macrófagos murinos através de seus glicoconjugados majoritários (LPG e GP63).

2. Justificativa

Como parte de um amplo projeto que tem como objetivo estudar a glicobiologia das espécies de *Leishmania* do Novo Mundo e sua importância durante o processo de interação, este trabalho avaliou seis cepas de *L. braziliensis*. Avaliamos a interação com macrófagos (peritoneais e medulares) no que tange à sua infectividade, estimulação e biogênese. Além disso, avaliamos preliminarmente a estrutura dos glicoconjugados (LPGs) de algumas cepas e seus perfis de ativação em macrófagos murinos. Sendo assim, investigamos se a variabilidade intra-específica no LPG e na GP63 seriam fatores determinantes para a virulência do parasito nestes eventos.

3. Objetivo geral

Caracterizar as diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis* e seus glicoconjugados na interação com macrófagos.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de produção de Óxido nítrico (NO) e citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α) em macrófagos peritoneais de C57BL/6 e respectivos “knock-outs” (TLR2 -/- e TLR4 -/-);
- Quantificar a ocorrência de fagocitose através do marcador Lamp-1 em macrófagos extraídos da medula óssea (BMM) de C57BL/6 expostos a LPGs de diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis*;
- Quantificar a ocorrência de fagocitose através de LAMP-1 e acidificação (LysoTracker) em BMMs de C57BL/6 infectados com as diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis*.
- Avaliar o polimorfismo intra-específico no LPG de cepas/isolados de *L. braziliensis*;

4. Metodologia

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

Neste estudo utilizamos cepas/isolados de *L. braziliensis* de diferentes formas clínicas, perfis genéticos e hospedeiros, conforme a Figura 2. Os procedimentos para o isolamento das cepas de pacientes foram aprovados pelo CONEP (processo no. 25000.037372/2008-88-ver anexos). Os procedimentos para a retirada de macrófagos peritoneais de camundongos foram aprovados pelo CEUA/FIOCRUZ (protocolo no. L-32/16). As formas promastigotas foram cultivadas em estufa BOD a 25°C em meio definido 199 (Sigma®), acrescido de soro fetal bovino (10%), penicilina (100 U/ml), streptomina (50 µg/ml), glutamina (12,5mM), HEPES (40 mM), adenina (0,1 mM) e hemina (0,0005%), pH 7,4 (Soares *et al.*, 2002).

Quadro 1: Cepas/isolados de *L. braziliensis* de acordo com origem, tipo de lesão e perfil genético.

Cepas/Isolados	Origem	Tipo de lesão	Perfil genético*
MHOM/BR/75/M2903	Pará/BR	Típica	Típico
MHOM/BR/1996/M15991	Belém/PA	Muco-cutânea	Típico
IWELL/BR/1981/M8401	Belém/PA	**	Típico
RR051	Belo Horizonte/MG	Típica	Típico
RR418	São João das Missões/MG	Típica	Atípico
RR410	São João das Missões/MG	Atípica	Atípico

Legenda: *, de acordo com (Garcia *et al.*, 2004); ** Cepa isolada de vetor. BR: Brasil; MG: Minas Gerais; PA: Pará.

4.2. Extração do DNA das promastigotas de *Leishmania braziliensis*

Para realização da técnica de PCR-RFLP do gene *hsp70* foram utilizadas culturas de promastigotas de *Leishmania* com concentração de aproximadamente 1×10^9 parasitos/mL. Primeiramente os parasitos foram centrifugados (3000 rpm, 7 minutos, à temperatura ambiente), o sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 1 mL de PBS 1x estéril. Para a extração do DNA genômico foi utilizado o Kit de Extração de tecido e células Gentra Puregene® da QIAGEN, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Após a extração, foi realizada a quantificação do DNA por Nanodrop®. As amostras de 5,0 µL DNA foram diluídas para a concentração de 20 ng/µL. A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 µL utilizando 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP mix (New England), 5,0% DMSO (Invitrogen), 2,5 unidades de Taq DNA polimerase Platinum® (Invitrogen), 0,4 pmol de iniciador senso *Hsp70*for - 5'GACGGTGCCTGCCTACTTCAA3' e 0,4 pmol de iniciador anti-senso *Hsp70*rev 5'CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3' (Garcia et al., 2004). A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 µL, contendo 1 µL de *Hae*III (New England) (10 U/µL), 1,5 µL de tampão da enzima 10x e 12,5 µL de produto de PCR. A mistura então foi incubada a 37°C por 2 horas. Os perfis de restrição foram analisados em gel de agarose 4% e comparados com o padrão obtido pela digestão do produto de PCR de cepas referência de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).

4.3. Extração e purificação de LPG

Para extrações utilizando até 1×10^9 células, foi empregado o método descrito por (Orlandi and Turco, 1987). Os parasitos foram lavados em PBS e centrifugados a 3000g por 10 minutos e ao pellet foi adicionado 2,5 ml CHCl₃/MeOH (3:2) e 0,5 ml MgCl₂ a 4 mM. O sedimento foi sonificado e o material centrifugado a 2100g por 7 minutos. Os GIPLs foram extraídos em CHCl₃/MeOH/H₂O (10:10:3) e o LPG em ESOAK (água/etanol/etil éter/piridina/NH₄OH; 15:15:5:1:0,017). Os extratos foram evaporados em nitrogênio a 45°C e purificados em coluna de fenil-sefarose (Soares et al., 2002; 2004).

4.4. Dot Blot

Para confirmar a presença dos LPGs, foi realizada a técnica de **Dot Blot** com o anticorpo específico anti-LPG CA7AE (1:1.000) que reconhece as unidades repetitivas de Gal(β 1,4)-Man(α 1)-PO₄ presente em todos os LPGs (Tolson et al., 1989). Foram adicionados 5 μ L de cada amostra contendo LPG diretamente na membrana de nitrocelulose, em um molde circular, sendo 1 μ L de cada vez até sua completa secagem. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1 hora em uma solução de caseína 5% e posteriormente incubada com o anticorpo primário específico durante o mesmo intervalo de tempo. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes com solução de PBS 1x em intervalos de 5 minutos entre cada lavagem e incubada por 1 hora com o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:10000). Após a última etapa de lavagem a membrana foi revelada com Luminol e visualizada pelo equipamento ImageQuant™ LAS 4000 (Nogueira et al., 2017).

4.5. Western Blot

Para avaliar a expressão de LPGs e GP63 em cada cepa/isolado, as formas promastigotas em fase estacionária foram lisadas e submetidas ao Western-blot em presença dos mAbs CA7AE (ver item 4.4), anti-GP63 e anti-aldolase (normalizador). Os tampões das lises continham 1% Nonidet P-40, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 135 mM NaCl, 1mM EDTA (pH8), 10 mM fenatrolina e varios inibidores de fosfatase e protease. Após a lise, os parasitos foram lavados em PBS gelado contendo 1Mm de ortovanato de sódio e 5 mM 1,10-fenantrolina. Após a quantificação de proteínas as amostras foram aquecidas em tampão de amostra de SDS, e foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%) com diferença de potencial constante de 100V. Em seguida as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (para os géis de GP63 e Aldolase) ou membrana de PDVF (polifosfoglicano) sob uma corrente de 12V, por 1 hora, utilizando o aparelho de transferência Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell. As membranas foram encubadas com anticorpos que marcam LPGs (CA7AE), GP63 (mouse mAb #235 marca a membrana ancorada ao GP63 de *L. major*), e ALD (*L. donovani* aldolase) como controle. A

atividade proteolítica foi verificada zimografia nos géis de SDS-PAGE e a imunodeteccção foi alcançada por quimioluminiscência (Amersham Biosciences) (Vinet et al., 2008).

4.6. Obtenção de macrófagos peritoneais

Os LPGs não radioativos purificados no item 4.3 foram incubados na presença de macrófagos peritoneais para se avaliar o seu perfil imunomodulador. Macrófagos induzidos com Tioglicolato de sódio 3% foram extraídos a partir de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 knockouts TLR2 (-/-) e TLR4 (-/-) por lavagem peritoneal com meio RPMI frio e enriquecido através de aderência ao plástico (1 h, 37 °C, 5% de CO₂). As células (3 x 10⁵ células/poços) foram lavadas com meio RPMI fresco e a cultura em meio RPMI, 2 mM glutamine, 50 U/mL de penicilina e 50 ug/mL de estreptomicina suplementado com 10% de FBS em placas de cultura de 96 poços (37 ° C, 5% de CO₂). As células foram primadas com IFN- γ (3 UI / mL) durante 18 h antes da incubação com LPGs (10 μ g/mL) e lipopolissacárido de *Escherichia coli* (LPS 100 ng/mL) (Ibraim et al., 2013; Nogueira et al., 2016).

4.7. Determinação dos níveis de citocinas e óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos

Para deteção de citocina por CBA multiplex, as células foram plaqueadas, preparadas como descrito acima e incubadas com LPGs durante 48 h. LPS foi adicionado como um controle positivo e o meio como controle negativo. Os sobrenadantes foram recolhidos e IL-6, IL-12 e TNF- α foram determinadas utilizando kits de ensaio de citocina camundongos CBA BD de acordo com as especificações do fabricante (BD Biosciences, CA, EUA). As dosagens foram realizadas na plataforma de citometria de fluxo (IRR) no FACSCalibur (BD Bioscience, Montanha View, CA, EUA). O pacote de software Cell-QuestTM fornecido pelo fabricante foi utilizado para aquisição de dados e o programa FlowJo 7.6.4 (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA) foi utilizado para análise de dados (Nogueira et al., 2016). As concentrações de nitrito foram determinadas pela reação de Griess (Griess Reagent System, 2009). Para as análises estatísticas foi realizado um pré-teste de normalidade, o teste de Kolmogorov-Smirnov (teste K-S ou teste KS) afim de demonstrar que os dados são paramétricos. Posteriormente realizados teste one-way ANOVA com os nossos dados parametricos pelo Software GraphPad Prism 6.0. (GraphPadSoftware Inc., San Diego, CA, EUA) . Os valores de P <0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todos os

dados são apresentados como média \pm SEM e representam a análise de três experimentos em duplicata.

4.8. Macrófagos e sincronização de fagocitoses

Os experimentos a seguir foram realizados no Laboratório coordenado pelo Dr. Albert Descoteaux no Institut National de la Recherche Scientifique, Institut Armand-Frappier, Laval, Canada. Estes experimentos possibilitaram o estágio da Estudante Tamara Vieira por 6 meses pelo convênio Programa de Líderes Emergentes das Américas (ELAP) financiado pelo governo Canadense.

Os macrófagos derivados da medula óssea (BMMs) foram obtidos das tíbias de fêmeas camundongos C57BL/6 de 6 a 8 semanas de idade (Charles River, St. Constant, QC, Canadá) e diferenciado em meio DMEM (Dulbecco's Eagle modified médium) suplementado com glutamina (Life Technologies, Burlington, ON, Canadá), 10% de soro bovino fetal inativado (FBS) (HyClone, Logan, UT), HEPES 20 mM, pH 7.4 e penicilina-estreptomicina suplementada com 15% (vol/vol) de meio celular com L929 (LCM) como uma fonte de estimulante de colônia fator 1 (CSF-1), a (37 ° , 5% de CO₂). Após 1 dia em cultura, as células não aderentes foram transferidas para novas placas de petri sem aderência e depois diferenciadas por 7 dias, quando a população continha praticamente 100% dos macrófagos maduros. Os macrófagos foram cultivados em meio sem CSF-1 por 18 h antes de serem usados.

Para a opsonização, as formas promastigotas foram incubadas em DMEM suplementado com 10% de soro deficientes de C8⁻ durante 25 min em estufa a 37°C antes da fagocitose. Os macrófagos com soro foram incubados durante 10 minutos a 4 ° C com os parasitos (MOI 10:1). Os parasitos não internalizados foram removidos por três lavagens em meios a 37 °C (uma com HBSS e duas com DMEM completo). As células foram incubadas em estufa a 37 °C durante um tempo total de 2 h. Posteriormente, os macrófagos foram lavados, fixados e as lâminas montadas para microscopia.

4.8.1. Cobertura e opsonização de partículas

Os LPGs purificados foram sonicados e adicionados as partículas de zimosan para uma concentração final de 25 mM em PBS, pH 7,3, incubado a 37 °C durante 1 h. As

partículas foram lavadas e ressuspensas em meio DMEM completo antes dos experimentos de fagocitose. A eficiência da integração dos LPGs no zimosan foi verificada através por imunofluorescência utilizando o anticorpo LAMP-1 Alexa 488 anti-rat (1:200). Para a sincronização dos ensaios de fagocitose, os macrófagos foram incubados com uma proporção de (7:1) partículas por célula durante 10 min a 4 °C. O excesso de partículas foi removido por várias lavagens com meio DMEM suplementado e as células foram incubadas a 37°C de acordo com os tempos indicados antes do processamento para microscopia. Para as análises estatísticas foi realizado um pré-teste de normalidade, o teste de Kolmogorov-Smirnov (teste K-S ou teste KS) afim de demonstrar que os dados são paramétricos. Posteriormente realizados teste one-way ANOVA com os nossos dados parametricos pelo Software GraphPad Prism 6.0. (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os valores a de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados destes experimentos são representativos de três ensaios em duplicata.

4.8.2. Imunofluorescência e microscopia confocal

Após a infecção, os macrófagos foram lavados e fixados com paraformaldeído a 2% em PBS. As células foram permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1% e os receptores de superfície Fcg não específicos foram bloqueados por BSA (1%) e 20% de soro. Os anticorpos utilizados foram LAMP-1 Alexa 488 anti-rat e Lysotracker Alexa 633. A marcação foi feita através da utilização de DRAQ5 (Biostatus, Leicestershire, UK) para revelar o DNA e as células foram montadas em lâminas utilizando 10 µL de Fluoromount (Southern Biotech, Interscience, Markham, ON, Canada) e posteriormente seladas com base. Para imunomarcção, as células e os parasitos foram marcadas com as combinações apropriadas de anticorpos primários (LAMP-1, anti-GP63, CA7AE e Lysotracker) e anticorpos secundários (AlexaFluor 488, 568, 633 e 647). DRAQ5 (Biostatus, Leicestershire, Reino Unido) foi utilizado para visualizar macrófagos e núcleos dos parasitas ,o número de promastigotas internalizados em macrófagos infectados foi determinado usando um Nikon Plan Fluor 60x (N.A. 0.85), montado num microscópio Nikon Eclipse E800 (Nikon, Melville, NY) equipado para microscopia de imunofluorescência padrão com filtros apropriados. O índice de infectividade (%) foram calculados baseados em 100 células infectadas escolhidas aleatoriamente em triplicata. Análise detalhada localização do fagossoma foi realizada usando

um óleo. A objetiva de imersão Nikon Plan Apo 100x (N.A. 1.4) foi montada em um microscópio Nikon Eclipse E800 equipado com um radiante Bio Rad 2000 sistema de imagem confocal (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). A excitação de fluorocromos foi conseguida usando um Laser de argônio-Krypton de 10 mW para 488 nm (LAMP-1 e mAb anti-GP63, Alexa488), um laser de 10 mW para 568 nm (CA7AE, Alexa 568), um laser de 10 mW para 633 nm (LysoTracker, Alexa 633) e um laser de 10 mW para 638 nm (Alexa647, DRAQ5). As imagens foram obtidas usando o apropriado filtros, através do modo de varredura seqüencial do LaserSharp software (Bio-Rad Laboratórios, Zeiss) com um filtro Kalman de pelo menos 4, e convertidos usando MRCtoM 1.9.3 e AdobePhotoshop 6.0. As imagens representativas correspondem à fatia confocal no meio do fagossoma; fatias maiores através de toda a célula também foram tomadas para verificar se os parasitas estavam totalmente envolvidos o fagossoma imaginado. O recrutamento foi avaliado por pontuação cega no fagossoma (Vinet et al., 2009). Para as análises estatísticas foi realizado um pré-teste de normalidade, o teste de Kolmogorov-Smirnov (teste K-S ou teste KS) afim de demonstrar que os dados são paramétricos. Posteriormente realizados teste one-way ANOVA com os nossos dados parametricos pelo Software GraphPad Prism 6.0. (GraphPadSoftware Inc., San Diego, CA, EUA). Os valores a de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados destes experimentos são representativos de três ensaios em duplicata.

4.8.3 Acidificação dos fagossomos

Os macrófagos derivados da medula óssea foram pré-marcados com corante de acidificação LysoTracker Red (Molecular Probes, Eugene, OR) diluído em DMEM (1: 2000) durante 2 h em estufa a 37°C. As células foram lavadas e infectadas com promastigotas durante 2 h e 24h em estufa a 37 °C como descrito no ensaio de fagocitose. As células foram lavadas, fixadas com paraformaldeído a 2% durante 20 minutos. Em seguida, foram lavadas novamente e incubadas durante 35 min com DRAQ5 (Biostatus, Leicestershire, UK) para revelar o DNA. As células foram montadas em lâminas utilizando 10 µL de Fluoromount (Southern Biotech, Interscience, Markham, ON, Canada) e posteriormente seladas com base antes da análise confocal de acordo com o item 4.10.2.

4.9. Marcação metabólica do LPG

Leishmania braziliensis produz menos LPGs que as outras espécies de *Leishmania* (Soares et al., 2005). Por esta razão e devido à dificuldade em se conseguir grandes quantidades de LPG para análises químicas, foi necessário utilizar uma técnica mais sensível, marcando os parasitos com galactose tritiada. As promastigotas de *L. braziliensis* foram colhidas e radiomarcadas em $1,5 \times 10^8$ - 10^9 células/mL com $90 \mu\text{Ci/mL}$ de $[6\text{-}^3\text{H}]$ galactose em 26°C , por 8 horas; o pH foi mantido com a adição de bicarbonato de sódio (Soares et al., 2002). O LPG radioativo foi extraído e purificado de acordo com o item 4.3.

4.10. Despolimerização do LPG e caracterização preliminar das unidades repetitivas

Os LPGs radioativos purificados foram despolimerizados pela hidrólise ácida branda (HCl a 0,02N, 100°C , 5 min). Em seguida, as amostras foram submetidas à partição butanol:água (1:2) passadas no vórtex e centrifugadas por 6-8 minutos a 14000 rpm. A fase superior (butanólica) contendo a porção central e a âncora lipídica do LPG foram desprezadas e o procedimento repetido. Na fração aquosa contendo as unidades repetitivas foi adicionado tolueno três vezes para evaporar o ácido (HCl) no fluxo de nitrogênio. Posteriormente, as amostras foram resuspendidas em Tampão Tris pH, 9.0. O pH da solução foi medido e ajustado com NaOH 0,1M quando necessário (Soares et al., 2002). As unidades repetitivas foram tratadas com fosfatase alcalina (37°C overnight) para retirada dos grupos fosfato (Mahoney et al., 1999). Para dessalinização as amostras foram submetidas à cromatografia de troca iônica (1 mL AG50W-X12 e 1 mL AG1-X8) e eluídas em água. As frações aquosas foram evaporadas em “speed vac”. A visualização das unidades repetitivas ocorreu através da técnica da cromatografia em camada fina (TLC) em que as amostras foram aplicadas em placas de sílica e colocadas em solução de butanol:piridina:água (6:4:3) por 20 horas (Soares et al., 2005). A quantificação da radioatividade foi realizada através da raspagem das placas de TLC em segmentos de 1 cm que foram embebidos em SDS a 1% e Instagel. As emissões radioativas foram detectadas no cintilador em colaboração com o Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CNEN).

5. Resultados

5.1 PCR-RFLP do *hsp70*

Após a tipagem das cepas pela reação de PCR-RFLP dirigida ao alvo *hsp70*, os perfis de restrição obtidos no gel foram idênticos àquele observado para a cepa referência de *L. braziliensis* (M2903) (Figura 2, canaletas 5 a 8). Porém, as cepas RR418 e RR410 apresentaram um perfil genético atípico comum às cepas isoladas na Reserva Indígena Xacriabá. Estes são polimorfismos de base única (SNPs) descritos por Quaresma et al. (2018). Estes resultados confirmam a identidade de todos os isolados/cepas de *L. braziliensis*.

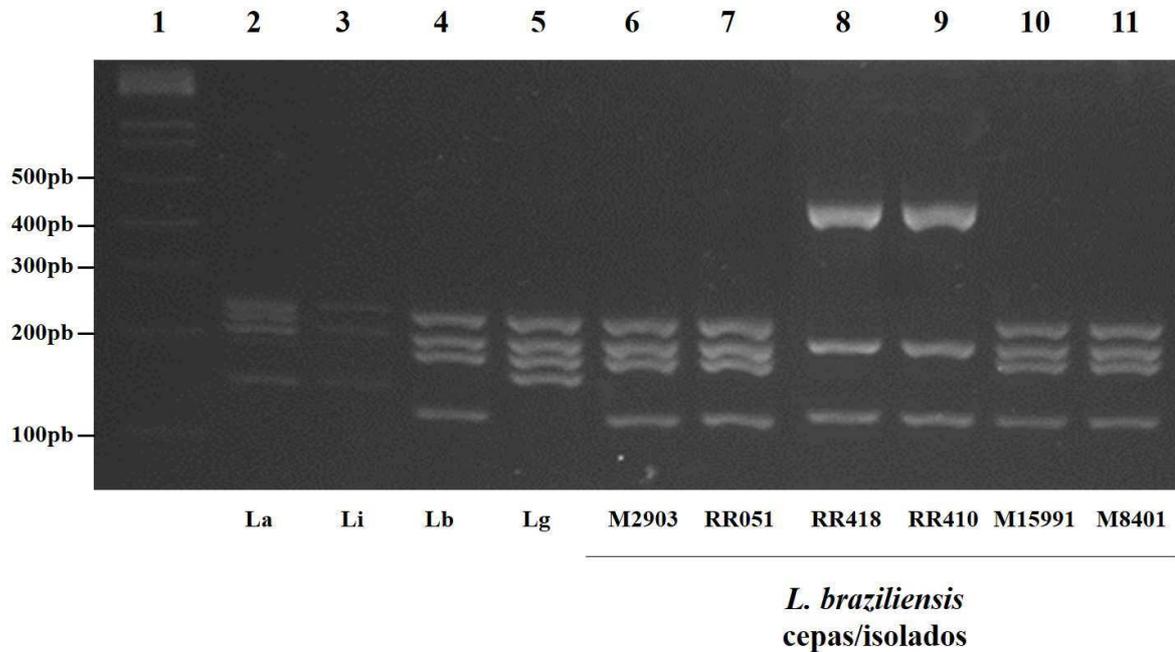


Figura 2: Perfil genético de diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis* utilizando o gene *hsp70*. Legenda: 1, marcador de peso molecular de 100-bp; 2, Cepa de referência de *L. amazonensis* (La) (IFLA/BR/75/PH8); 3, Cepa de referência de *L. infantum* (Li) (MHOM/BR/74/PP75); 4, Cepa de referência de *L. braziliensis* (Lb) (MHOM/BR/75/2903); 5, Cepa de referência de *L. guyanensis* (Lg) (MHOM/BR/75/M4147); 6, Cepa de lesão típica de *L. braziliensis* (M2903); 7, Isolado de lesão típica (RR051); 8, Isolado de lesão típica (RR418 com perfil atípico); 9, Isolado de uma lesão atípica (RR410 com perfil atípico); 10, Cepa isolada de lesão mucocutânea (M15991) e 11, Cepa isolada do vetor (M8401).

5.2 Dot Blot

Com base no dot-blot, todos os LPGs das cepas/isolados de *L. braziliensis* foram purificados com sucesso. Conforme esperado, o LPG de *L. infantum* (Ba262) (controle positivo) foi reconhecido pelo anticorpo CA7AE (Figura 3).

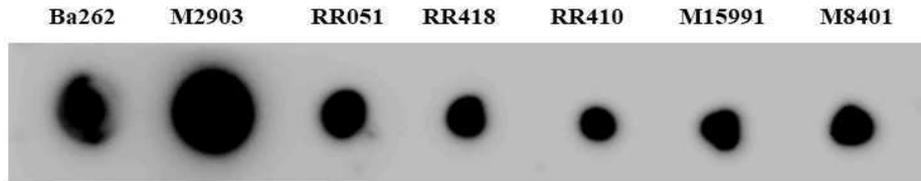


Figura 3: Reatividade dos LPGs purificados (10 µg) das cepas/isolados de *L. braziliensis* (M2903, RR051, RR418, RR410, M15991 e M8401) em presença do anticorpo CA7AE (1:1000). Controle positivo: LPG de *L. infantum* (cepa Ba262).

5.3 Perfil de produção de citocinas e óxido nítrico (NO)

Os macrófagos estimulados por LPGs das diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis* foram capazes de induzir a produção de NO e citocinas (IL-6, IL-12 e TNF- α) preferencialmente via TLR4 (Fig. 4A-D). Em geral, foi observado que independente da forma clínica (típica, atípica ou muco-cutânea) ou hospedeiro (homem ou vetor), que os LPGs estimularam diferencialmente os macrófagos murinos. Vale ressaltar que o LPG da cepa M15991 (muco-cutânea) foi muito pouco pró-inflamatório, enquanto que aquele da cepa de vetor foi tão pró-inflamatório quanto o controle positivo LPS. Os LPGs dos isolados que continham os perfis de restrição genéticos atípicos (RR418 e RR410) foram bastante pró-inflamatórios quando comparados àqueles com os perfis de restrição típicos (M2903, RR051 e M15991), exceto o M8401. Não foi detectada a produção de IL-1 β (dados não mostrados).

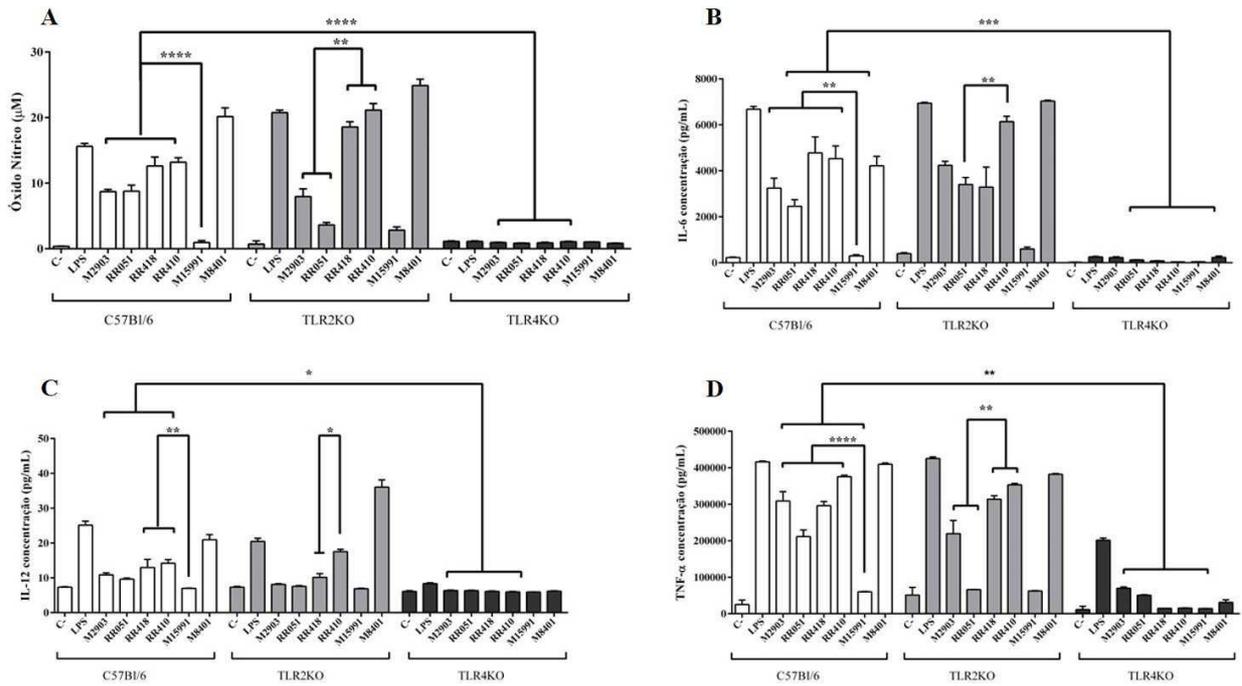


Figura 4: Produção de óxido nítrico (NO) e citocinas (IL-6, IL-12 e TNF- α) por macrófagos murinos estimulados por LPGs (10 μ g/mL) de diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis*. (A), NO; (B), IL-6; (C), IL-12 and (D), TNF- α . C = controle negativo (meio); LPS (100 ng/mL, controle positivo). M2903, RR051 e RR418 = LPGs de *L. braziliensis* isolados de cepas de lesões típicas; RR410 = LPG de *L. braziliensis* isolado de cepa de lesão atípica; M15991 = LPG isolado de cepa de lesão mucocutânea; M8401 = LPG isolado de cepa de vetor. Os resultados são representativos de 3 experimentos em duplicata. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

5.4 Cromatografia em camada fina das unidades repetitivas dos LPGs

Através da cromatografia em camada fina, as unidades repetitivas dos LPGs das cepas/isolados M2903 (típica, controle), RR051 (típica) e M15991 (muco-cutânea) foram preliminarmente caracterizadas. Conforme esperado, as unidades repetitivas do LPG da cepa M2903 possibilitaram a identificação do dissacarídeo Gal-Man comum a todos os LPGs e também de um tri- e tetrassacarídeo (Soares et al., 2005) (Fig. 5A). O isolado RR051 apresentou picos característicos de Gal-Man e Hex-Hex-Gal-Man (Fig. 5B). Finalmente, as unidades repetitivas do LPG da cepa M15991 apresentaram apenas unidades repetitivas sem cadeias laterais, ou seja, apenas o dissacarídeo Gal-Man (Fig. 5C). Estes resultados confirmam a existência de polimorfismos intra-específicos nas unidades repetitivas do LPG de *L. braziliensis*. Entretanto, não foi possível obter os resultados de cromatografia para os isolados/cepa RR418, RR410 e M8401. Estes experimentos serão repetidos para finalizar esta parte.

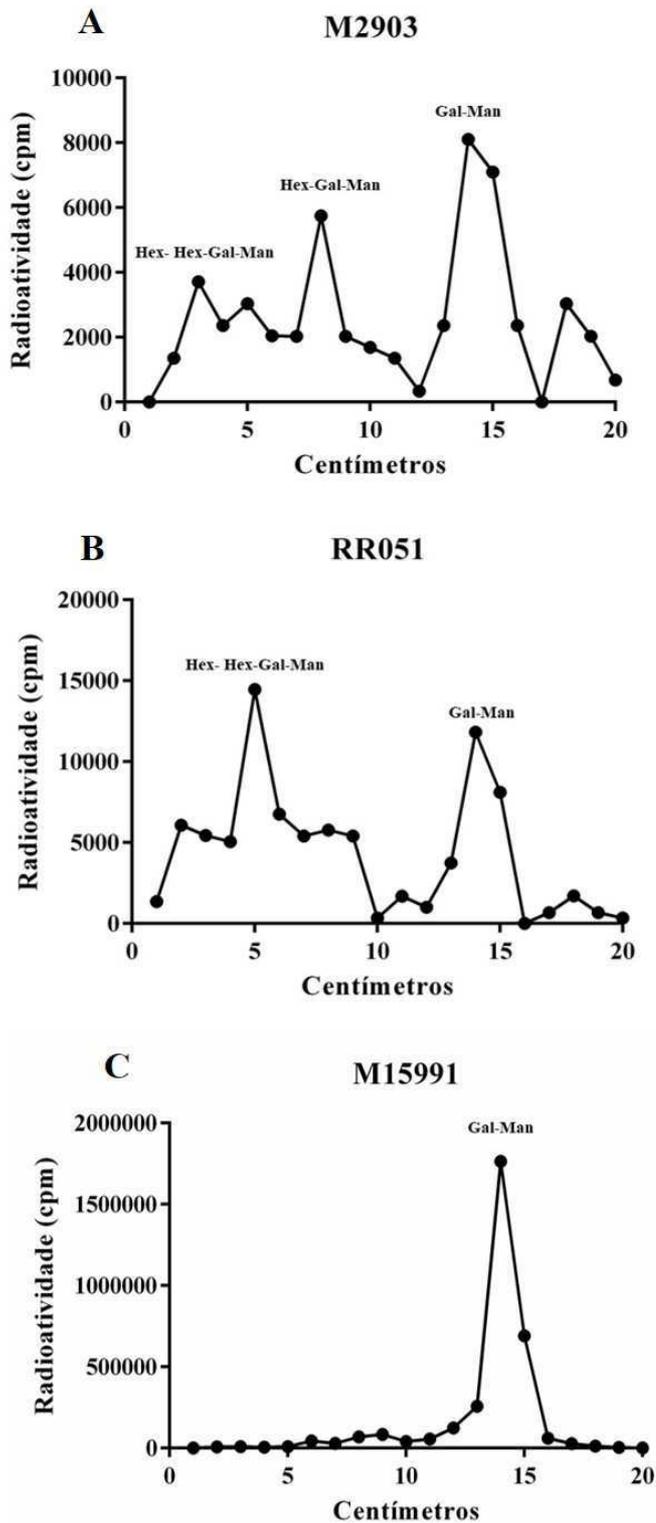


Figura 5: Cromatografia em camada fina de unidades repetitivas marcadas com $[6-^3\text{H}]$ galactose de LPGs de diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis*. A, unidades repetitivas do LPG da cepa de lesão típica (M2903); B, unidades repetitivas do LPG da cepa de lesão típica (RR051); C, unidades repetitivas do LPG da cepa de lesão muco-cutânea (M15991). Legenda: Gal, galactose; Man, manose; Hex, hexose.

5.5 Infectividade em macrófagos derivados da medula óssea

Os macrófagos extraídos da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram infectados durante 2 horas com as cepas/isolados de *L. braziliensis* a cepa controle de *L. donovani* (LV9) a fim de se calcular o índice de infectividade (%). Foi observado um perfil variável de infecção entre as cepas, porém semelhante ao controle de *L. donovani* ($P > 0,05$) (Figura 6). As cepas M2903, M15991 e M8401 foram mais infectivas que o isolado RR410 ($P < 0,05$). A única cepa que foi mais infectiva que o controle (LV9) for a cepa de vetor ($P < 0,05$).

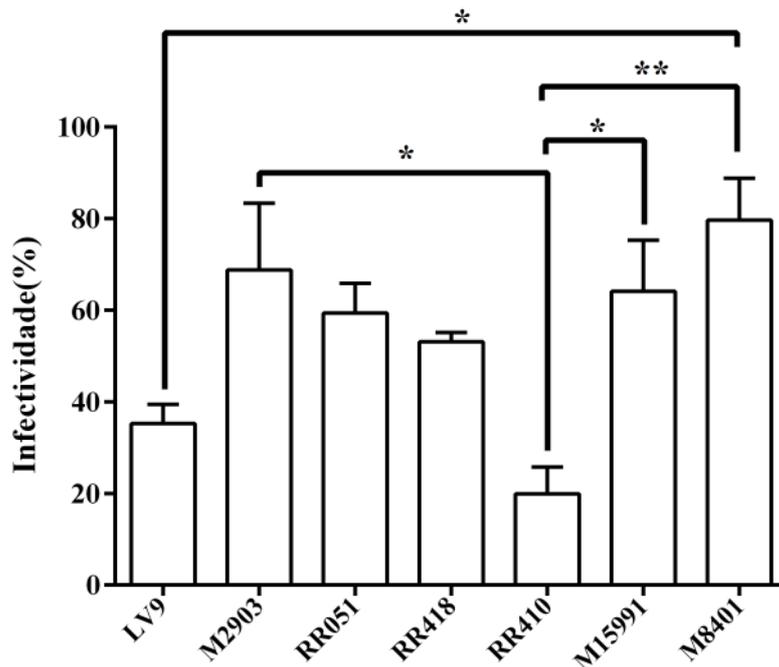


Figura 6: Índice de infectividade (%) de diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis* após duas horas de infecção. Os resultados são representativos de 3 experimentos em duplicata. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

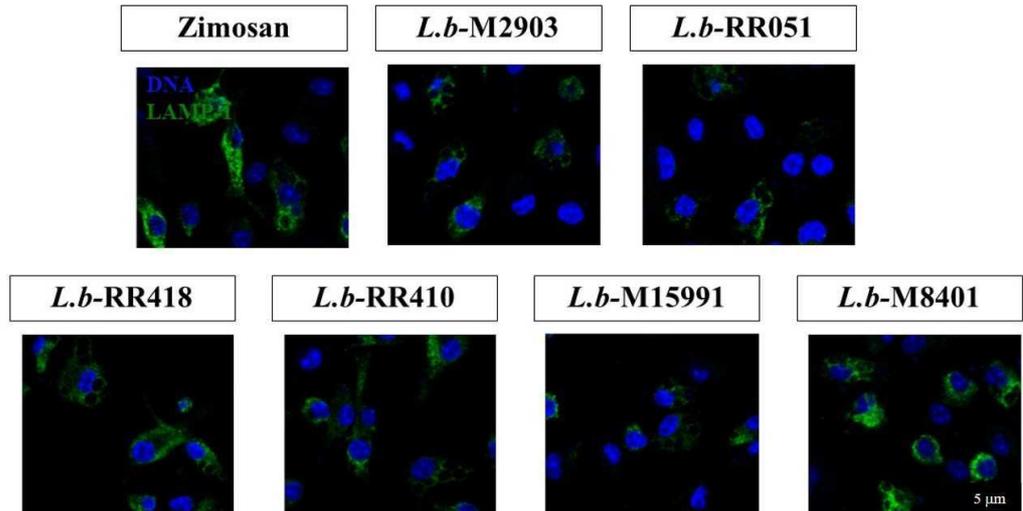
5.6 Recrutamento de LAMP-1 em partículas de zimosan cobertas com LPG

Para avaliar o recrutamento de LAMP-1 nos fagossomos, macrófagos medulares foram incubados com partículas de zimosan + LPGs purificados de diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis* durante 10 minutos e 2 horas. As imagens (Figura 7A e 7B) são apenas ilustrativas e sua análise final está representada sob a forma de gráficos de barras (Figura 8). Não foram observadas diferenças significativas no recrutamento de LAMP-1 em nenhum dos dois tempos analisados (Figura 8). As análises estatísticas foram realizadas através do teste one-way ANOVA utilizando dados paramétricos pelo Software GraphPad Prism 6.0. Os

valores a de P a partir $<0,05$ foram considerado estatisticamente significativo. Todos os dados são apresentados como média \pm SEM (Figura 8).

A

10min



B

2h

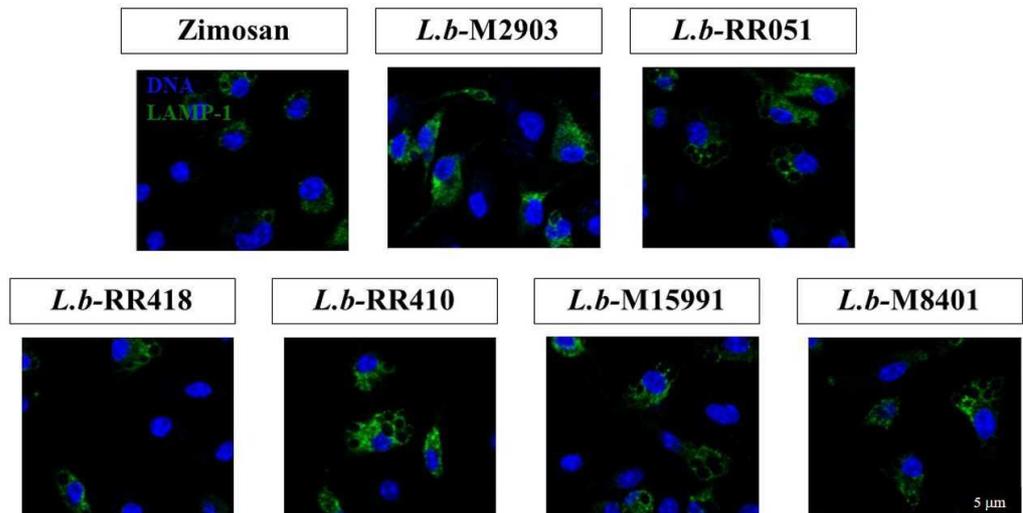


Figura 7: Efeito do zimosan + LPG de diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis* no recrutamento de LAMP-1 após 10 minutos (A) e duas horas (B) de fagocitose. Escala = 5 μ M.

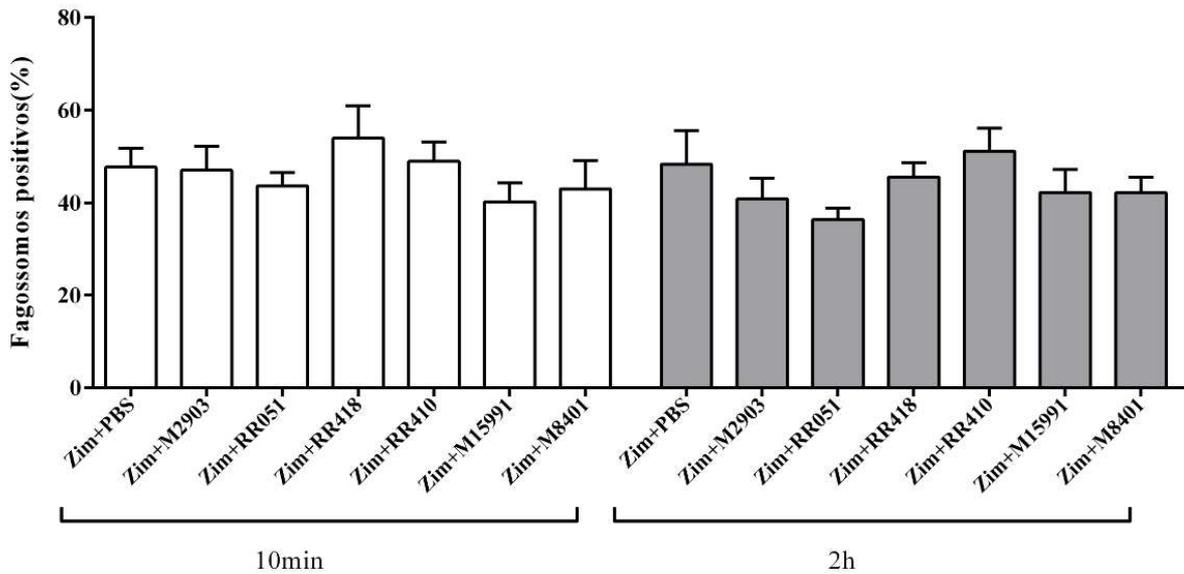


Figura 8: Recrutamento de LAMP-1 nos fagossomos de células expostas com partículas de zimosan cobertas com LPGs purificados de diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis* a em diferentes tempos de fagocitose 10 minutos (barras brancas) e 2 horas (barras cinzas). Os resultados são representativos de 3 experimentos em duplicata.

5.7 Recrutamento de LAMP-1 nos fagossomos de macrófagos infectados com promastigotas de diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis*

Considerando que as moléculas de LPG purificadas não afetaram o recrutamento de LAMP-1, nosso próximo passo foi investigar o papel dos parasitos inteiros. As imagens (Figura 9A e 9B) são apenas ilustrativas e sua análise final está representada sob a forma de gráficos de barras (Figura 10). No tempo 2 horas, os parasitos (RR051 e M15991) apresentaram um maior recrutamento de LAMP-1 em relação ao controle negativo (LV9) ($P < 0,05$, Figura 10). Conforme esperado, o controle positivo (zimosan) apresentou um maior recrutamento de LAMP-1 em ao controle negativo (LV9) e a cepa isolada de uma lesão atípica (RR410). Já em 24 horas, onde a infecção está estabelecida, algumas diferenças se tornaram mais evidentes. Os parasitos (RR051 e M8401) apresentaram um maior recrutamento de LAMP-1 comparado a LV9. Além disso, este recrutamento foi maior do que as cepas com perfil genético atípico (RR418 e RR410) ($P < 0,05$, Figura 10).

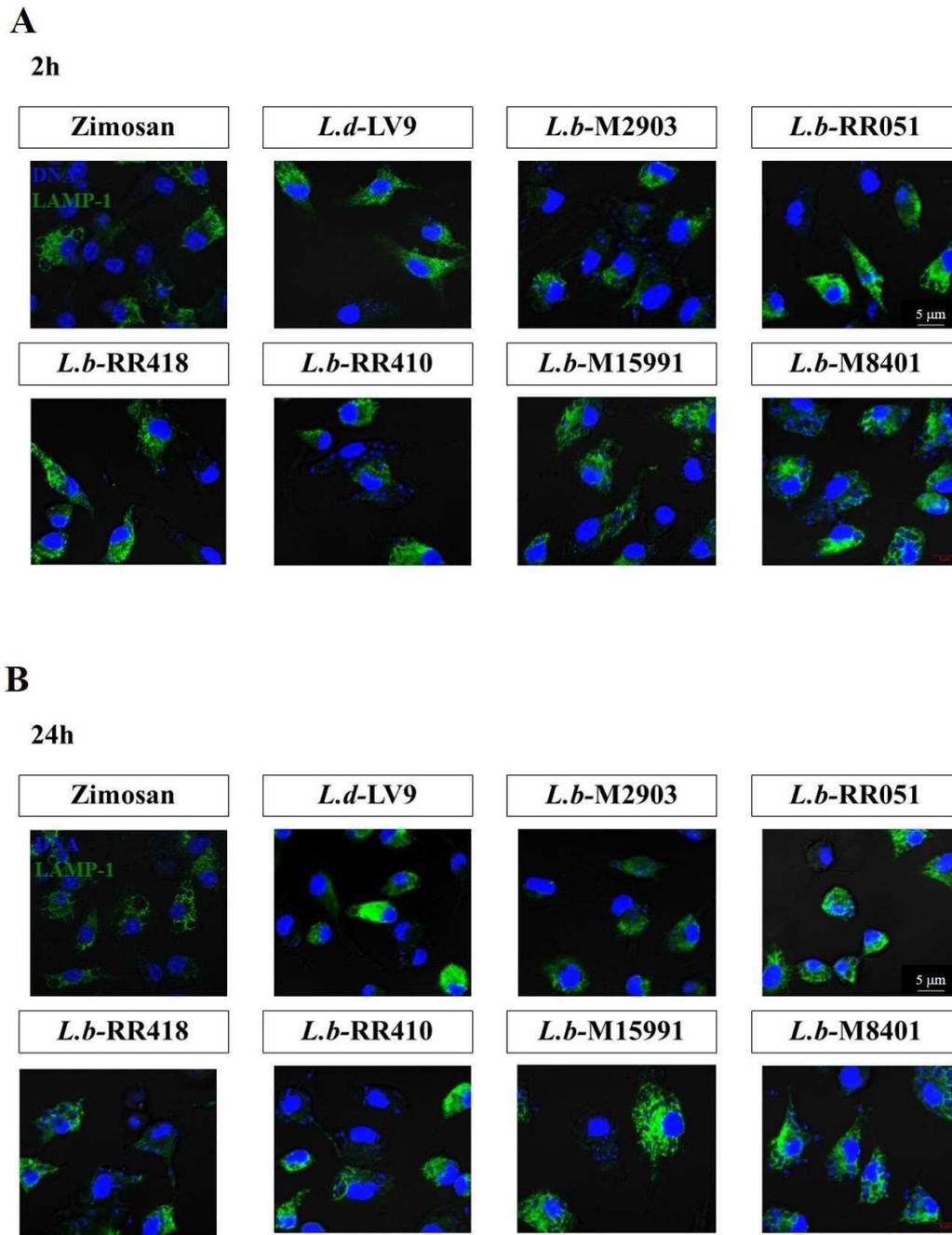


Figura 9: Efeito dos parasitos de diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis* no recrutamento de LAMP-1 após 2 (A) e 24 horas (B) de fagocitose. Escala = 5 μ M.

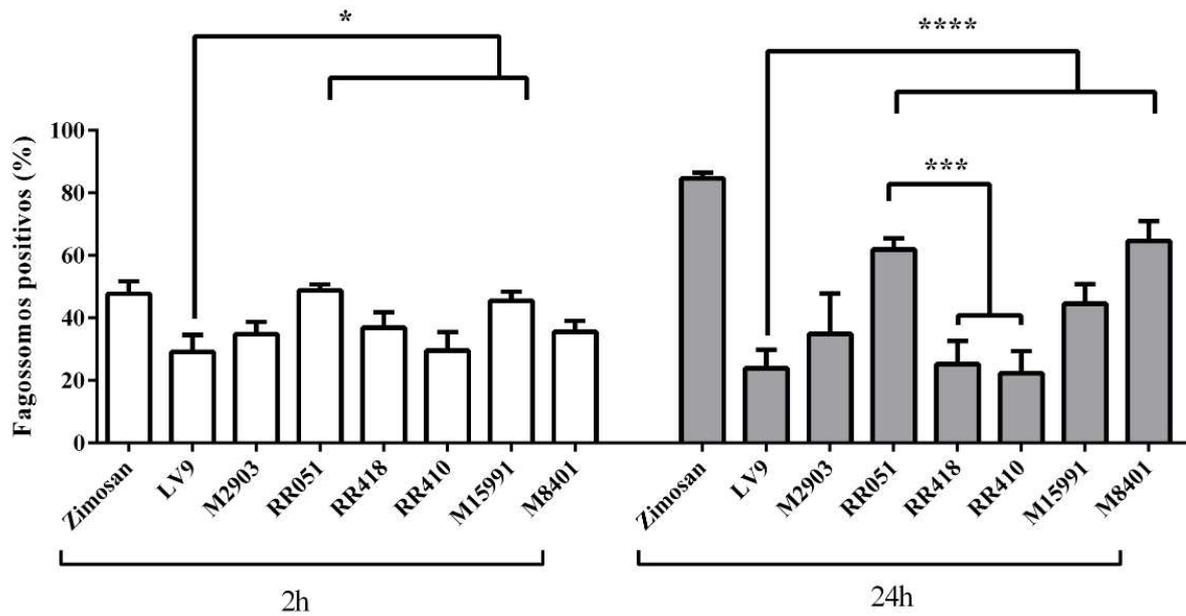


Figura 10: Recrutamento de LAMP-1 nos fagossomos de células infectadas com parasitos de diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis* em diferentes tempos de fagocitose (2 h, barras brancas) e 24 horas (barras cinzas). Zimosan, controle positivo e *L. donovani* (LV9, controle negativo). Os resultados são representativos de 3 experimentos em duplicata. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

5.8 Acidificação nos fagossomos de macrófagos infectados com cepas/isolados de *L. braziliensis*

Visto que os parasitos inteiros apresentaram um recrutamento de LAMP-1 variável nas cepas/isolados de *L. braziliensis* resolvemos investigar o papel dos parasitos na acidificação nos fagossomos usando LysoTracker. As imagens (Figura 11A e 11B) são apenas ilustrativas e sua análise final está representada sob a forma de gráficos de barras (Figura 12). No tempo 2 horas, a cepa atípica (RR410) acidificou mais do que as outras cepas/isolados (exceto a cepa M8401) e o controle negativo (LV9) ($P < 0,05$, Figura 12). No tempo 24 horas, a cepa mucocutânea (M15991) acidificou menos que todas as cepas/isolados de *L. braziliensis*, apresentando um perfil semelhante ao controle negativo (LV9) ($P < 0,05$, Figura 12).

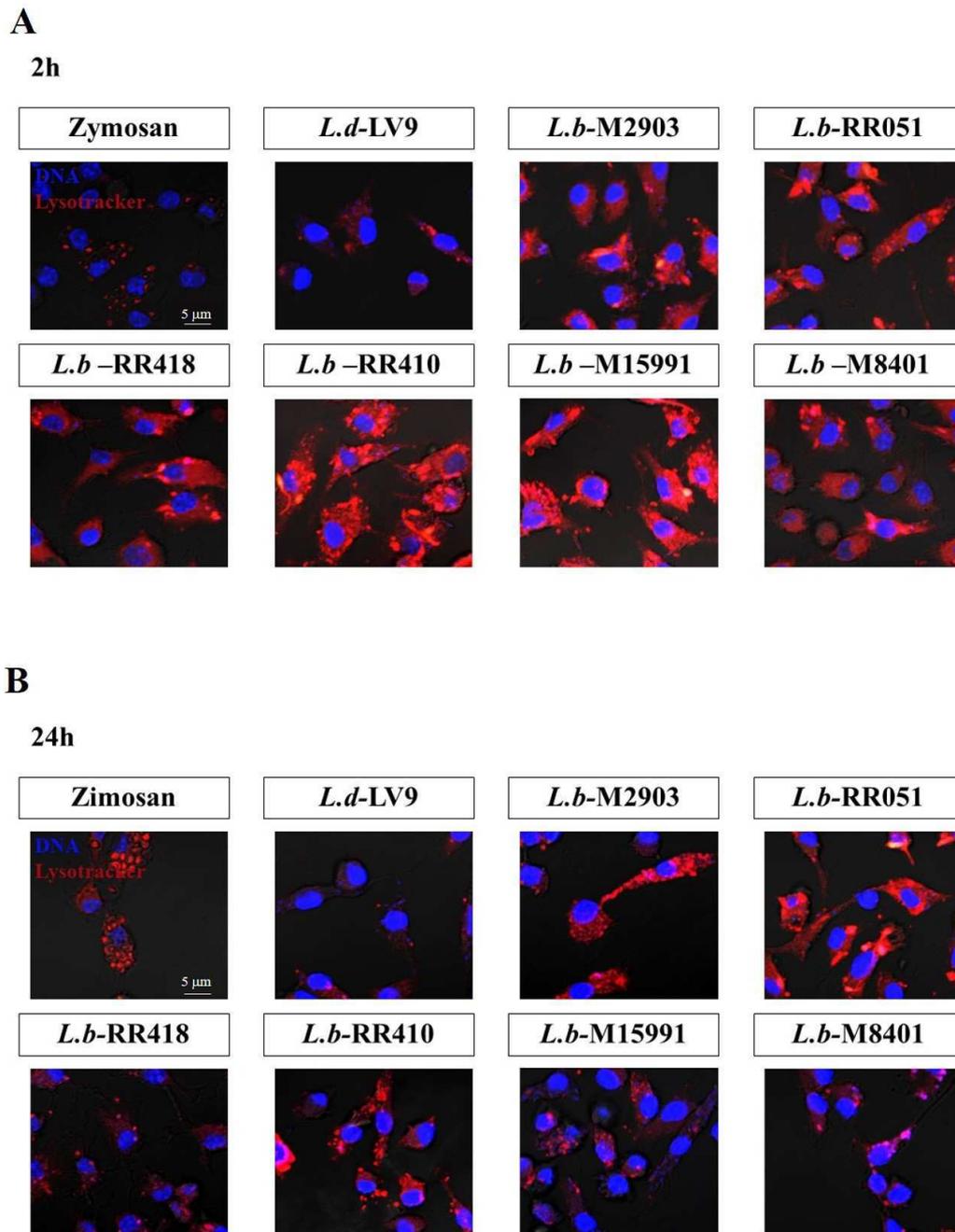


Figura 11: Efeito dos parasitos de diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis* mostrando a acidificação pelo Lysotracker após 2 (A) e 24 horas (B) de fagocitose. Escala = 5 µm. Legenda, parasitos (azul) acidificação com Lysotracker demonstrando a acidificação nos parasitos (vermelho)

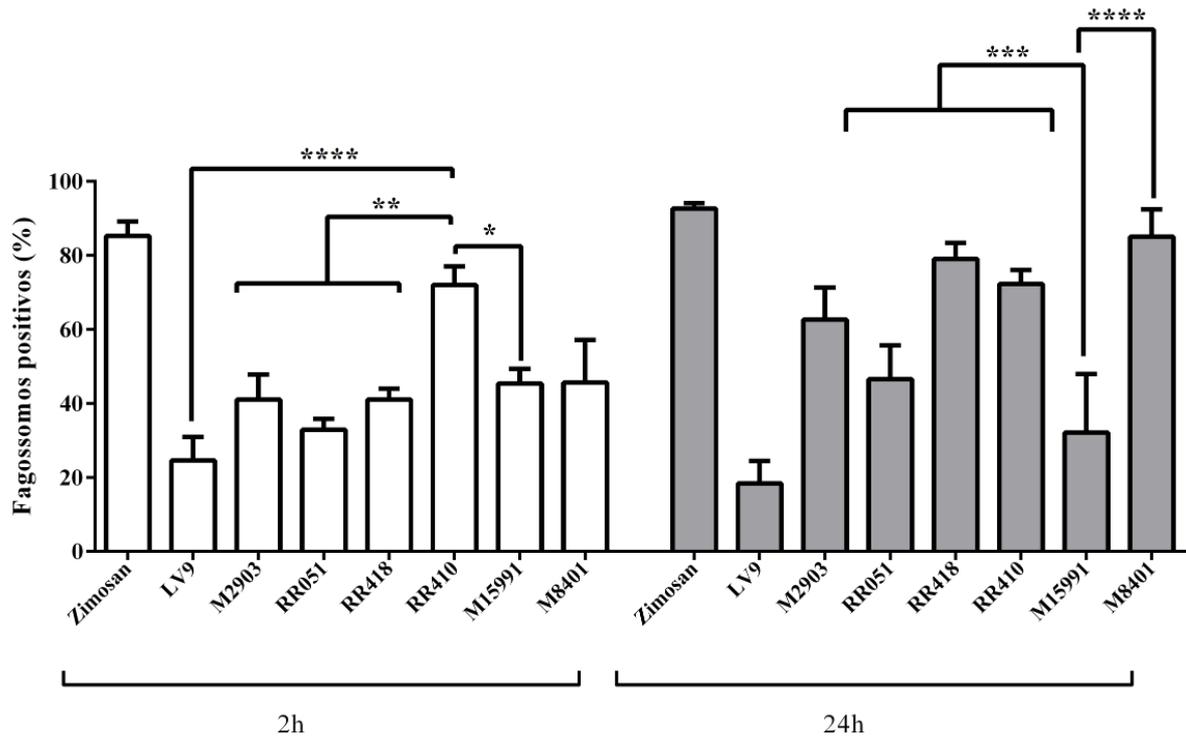


Figura 12: Acidificação em fagossomos infectados com diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis* em diferentes tempos de fagocitose (2 h, barras brancas) e 24 horas (barras cinzas). Zimosan, controle positivo e *L. donovani* (LV9, controle negativo). Os resultados são representativos de 3 experimentos em duplicata. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

5.9. Expressão diferencial de glicoconjugados (LPG e GP63)

Como foi observado nos parasitos inteiros uma expressão diferencial de LPG e GP63, nosso próximo passo foi avaliar quali-quantitativamente estes glicoconjugados pela técnica de western-blot após a lise dos parasitos. Nos controles foram utilizados parasitos de *L. major* (NIHSA2) e *L. donovani* (LV9). Podemos verificar uma expressão diferencial de LPG nas diferentes cepas/isolados (evidenciado pelos arrastes) nas cepas de *L. major* (NIHSA2), *L. donovani* (LV9) e *L. braziliensis* (RR410) (Figura 13A). Os outros isolados apresentaram baixa expressão de LPG, uma vez que não foram vistos arrastes visíveis. Isto porquê o anticorpo CA7AE reconheceu inespecificamente algumas proteínas do lisado. Quando comparamos a expressão de LPG entre as diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis*, observamos que a cepa de lesão atípica e perfil genético atípico RR410 expressou este glicoconjugado em maior quantidade (Figura 13A). Em relação a GP63, observamos uma expressão também variável deste glicoconjugado. Entretanto, não observamos uma correlação nítida entre a expressão desta protease com aquela de LPG. Além disso, não foi detectado uma correlação entre a GP63 e as formas clínicas (Figura 13B). Vale ressaltar que a cepa

M8401 (vetor) que apresentou alta expressão de GP63 em sua membrana, não foi detectada no western-blot. Isto pode ser devido às diferentes concentrações do anticorpo secundário utilizado nas duas técnicas. Entretanto, a atividade proteolítica desta GP63 foi detectada (Figura 13C), inclusive sendo maior que em outras cepas, confirmando que o seu reconhecimento pode ter sido prejudicado pelo aquecimento da amostra. Ainda em relação à atividade proteolítica, também não foi observada correlação entre a expressão e maior atividade. Por exemplo, cepas/isolados com baixa expressão (M2903 e RR051) apresentaram considerável atividade proteolítica quando comparadas à cepa controle de *L. major* (Figura 13C). Finalmente, o normalizador aldolase confirma que foram aplicadas as mesmas concentrações de amostra em cada canaleta (Figura 13D). Ao verificarmos a atividade proteolítica de GP63 verificamos que a cepa controle *L. major* e a cepa isolada de uma lesão típica M2903 apresentaram os maiores níveis de atividade. Já as outras cepas não apresentaram níveis mais baixos de atividade de GP63 (Figura 13C). O gel de aldolase apresentou basicamente os mesmos quantidades de proteína para todas as cepas utilizadas (Figura-13D).

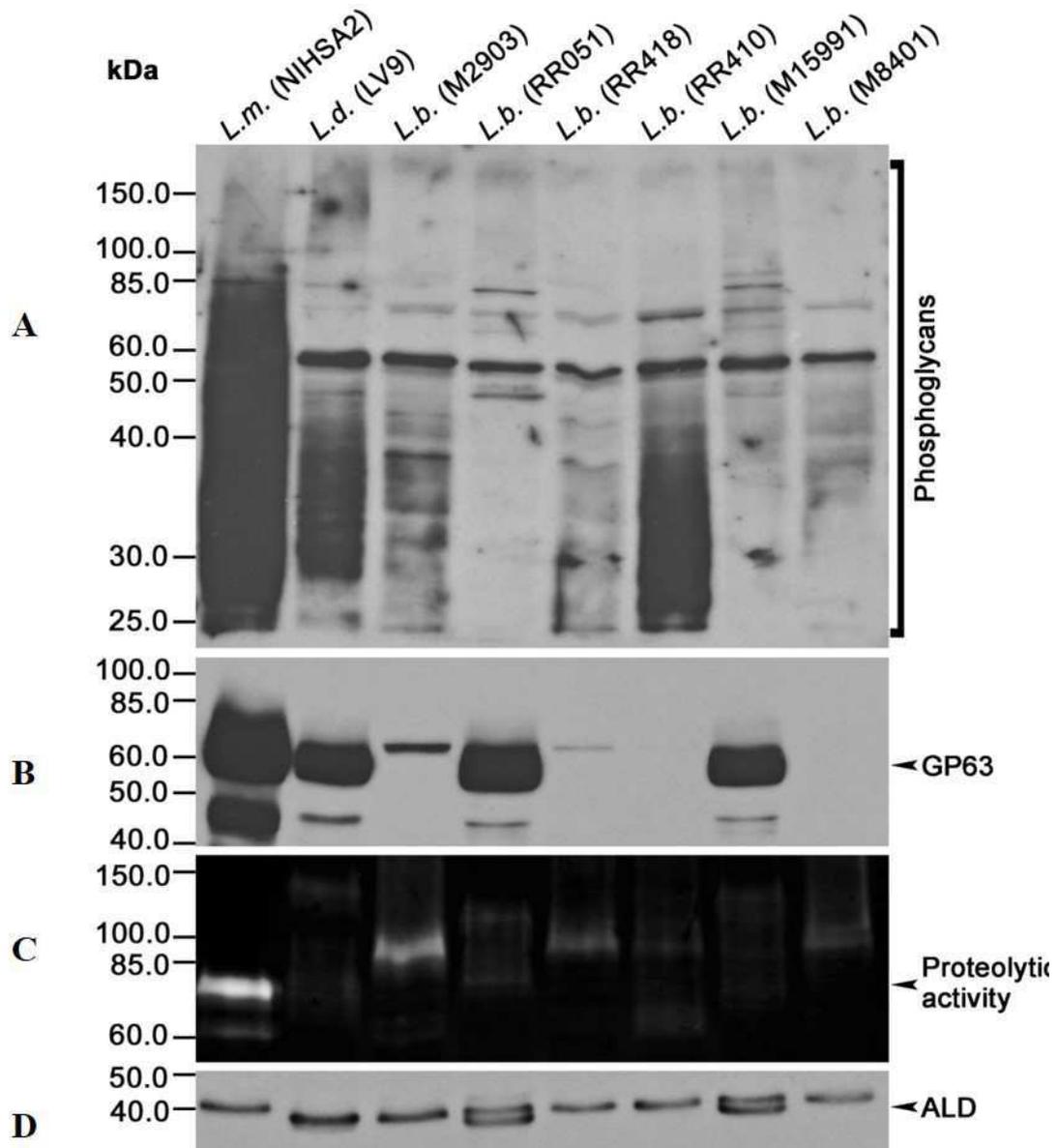


Figura 13: Expressão de LPG (A), GP63 (B) e atividade proteolítica (C) de diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis*. Controles *L.m.*-NIHSA2 (*L. major*), *L. d.*-LV9 (*L. donovani*) e aldolase (D, normalizador). Isolados de *Leishmania braziliensis* *L.b.*- M2903 (cepa isolada de lesão típica), *L.b.*-RR051 (cepa isolada de lesão típica), *L.b.*-R418 (cepa isolada de lesão típica), *L.b.*-RR410 (cepa isolada de lesão atípica), *L.b.*-M 15991 (cepa isolada de lesão mucocutânea) e *L.b.*- M8401 (cepa isolada do vetor).

6. Discussão

Vários fatores podem estar ligados aos diferentes níveis de virulência entre cepas de uma determinada espécie de *Leishmania*. No caso de *L. braziliensis*, esta espécie pode causar diferentes tipos de manifestações clínicas que vão desde lesões únicas e simples até formas atípicas ou graves como muco-cutânea (Guimarães et al., 2016b; Quaresma et al., 2018). Neste trabalho investigamos o papel de vários parâmetros que poderiam explicar estas diferenças na patogenia e virulência.

Estudos da diversidade genética em *L. braziliensis*, assim como estudos populacionais, tem despertado o interesse de vários pesquisadores com o intuito de investigar associações entre as características genéticas deste parasito com a distribuição geográfica e manifestações clínicas da doença (Marco et al., 2015; Queiroz et al., 2012). Neste contexto, um estudo anterior de nosso grupo que foi recentemente publicado, caracterizou dentre várias cepas, algumas das utilizadas em nosso estudo (Quaresma et al., 2018). Neste trabalho, os fragmentos de todas as cepas do presente estudo foram sequenciados e as sequências obtidas tiveram identidade igual ou superior a 98% frente às sequências depositadas no GenBank para *L. braziliensis* (Quaresma et al., 2018). Inicialmente, para garantir a confiabilidade das cepas/isolados nesta dissertação fizemos uma tipagem por PCR-RFLP (Garcia et al., 2004), onde confirmamos os perfis genéticos típicos (com quatro bandas) e atípicos (com três bandas) (Quaresma et al., 2018). Este último, é resultado de um polimorfismo de base única (SNPs) na sequência do gene da HSP70 (heat shock protein) (Quaresma et al., 2018) (Figura 2). Interessante observar que embora a cepa RR418 tenha um perfil atípico, a mesma foi isolada de uma lesão com aspecto típico, reforçando a ideia de que outros fatores além da genética, podem estar relacionados à manifestação clínica. Em conjunto, nossos dados corroboram com o estudo anterior (Quaresma et al., 2018) confirmando que todas as nossas cepas/isolados são *L. braziliensis*.

Além dos aspectos genéticos, o papel de moléculas presentes na superfície do parasito (PAMPs) também pode afetar a resposta imune do hospedeiro (revisado por Assis et al., 2012). Sabe-se já a algum tempo que fator de virulência multifuncional LPG é capaz de induzir citocinas e NO (Brittingham and Mosser, 1996), sendo que esta indução era mediada por MAPKs (Feng et al., 1999). Posteriormente, foi demonstrado que o LPG de *L. major* era um potente agonista de TLR2 em células natural-killer (NK) e em macrófagos murinos

(Becker et al., 2003; de Veer et al., 2003). Esta ativação desencadeia a produção de TNF- α e IFN- γ via MyD88, sendo a integridade da âncora lipídica necessária. Confirmando estes resultados, a integridade da âncora lipídica do LPG de *L. Infantum* também foi necessária para a ativação de PPAR- γ (Lima et al., 2017b). Uma resposta imune celular capaz de controlar a infecção por *Leishmania* é bastante dependente de IFN- γ , pois aumenta a resposta microbicida dos macrófagos através da indução da síntese de NO (Flandin et al., 2006; Mosser and Edwards, 2008). Em *L. braziliensis*, sabemos que o LPG desta cepa é capaz de ativar NO e outras citocinas via TLR4/TLR2 (Ibraim et al., 2013). Em nosso trabalho, observamos que os LPG das diferentes cepas/isolados apresentaram uma modulação variável de NO e citocinas em macrófagos murinos preferencialmente via TLR4. Esses resultados foram semelhantes aos observados para os LPGs de duas cepas de *L. amazonensis* (PH8 e Josefa), também dermatrópicas (Nogueira et al., 2016). Os LPGs oriundos de cepas/isolados com perfil genético atípico (RR418 e RR410) apresentaram uma maior produção de nitrito do aquelas com perfil típico (M2903, RR051 e M15991). Esse padrão foi similar também para IL-6 e TNF- α . Em relação ao LPG da cepa isolada do vetor (M8401, perfil genético típico), sua atividade pró-inflamatória foi muito alta sendo comparável ao do LPS. Nossos resultados confirmam os da literatura de que macrófagos primados são capazes de produzir NO em presença de LPG, e que essa produção é variável entre as espécies e cepas (Coelho-Finamore et al., 2011; Nogueira et al., 2016; Paranaíba et al., 2015; Proudfoot et al., 1996). Já a cepa isolada da lesão muco-cutânea (M15991) induziu uma produção muito baixa de NO e citocinas tendo uma resposta mais imunossupressora semelhante àquela desencadeada por LPGs de *L. infantum* e *L. amazonensis* (Ibraim et al., 2013; Nogueira et al., 2016). Esse baixo potencial pró-inflamatório presente na cepa muco-cutânea poderia ser devido à ausência do vírus LRV1 (Macedo et al., 2016), que é responsável por aumentar da virulência do parasito via TLR3 (Ives et al., 2011). Outros fatores que poderiam estar afetando a virulência das cepas poderiam estar relacionados à ecto-nucleotidases (Leite et al., 2012). Neste trabalho, foi observado que havia uma correlação entre a alta atividade destas enzimas com o aparecimento das lesões mais graves. Entretanto, a cepa utilizada em nosso estudo foi diferente e não sabemos como seria a sua atividade ecto-nucleásica. Além disso, IL-6 já foi descrita como um fator de risco para a leishmaniose muco-cutânea (Castellucci et al., 2012). Entretanto, o LPG desta cepa não foi capaz de desencadear a produção desta citocina sugerindo outras vias por outros fatores. IL-1 β e IL-6 são citocinas pró-inflamatórias importantes agindo nas células

endoteliais aumentando o número de moléculas de adesão e migração de leucócitos para o local da inflamação. Além disso elas favorecem os danos nos tecidos aumentando a inflamação, atraindo e ativando neutrófilos (Boaventura et al., 2010; Castellucci et al., 2006; Mul et al., 2000; Sallusto et al., 2012). Em nossos experimentos, não detectamos a indução de IL-1 β pelos LPGs dos isolados estudados. Entretanto, vimos um perfil variável para a citocina IL-6 não podendo descartar o seu papel na imunopatologia da leishmaniose por *L. braziliensis*. Um resultado que devemos ressaltar foi a maior produção de NO, IL-6 e TNF- α pelas cepas com perfil genético atípico. Entretanto, para IL-12, a produção só foi estatisticamente diferente em relação à cepa muco-cutânea. Esses resultados em conjunto mostram que os glicoconjugados de várias cepas/isolados de *L. braziliensis* podem modular diferencialmente a produção de NO e citocinas. Em última análise, macrófagos estimulados por LPGs de *L. braziliensis* apresentaram um perfil mais pró-inflamatório.

A fim de se investigar se estas diferenças no potencial pró-inflamatório poderiam ser devido a polimorfismos nas unidades repetitivas dos LPGs, foram realizadas análises preliminares destas porções. Polimorfismos nas unidades repetitivas dos LPGs já foram observadas em várias espécies de *Leishmania* tanto do Velho [L. *donovani* (Sudão e Índia); L. *major* (cepas FV1 e LV39); L. *tropica* (cepas L747, L863 e L810)] quanto Novo Mundo [L. *infantum* (14 cepas) e L. *amazonensis* (cepas PH8 e Josefa)] (Coelho-Finamore et al., 2011; Dobson et al., 2003; Mahoney et al., 1999; Nogueira et al., 2017; Sacks, 1995; Soares et al., 2004). Foi observado para *L. infantum*, que LPGs mais complexos, ou seja, com cadeias laterais nas unidades repetitivas, desencadearam uma maior produção de NO por macrófagos murinos (Coelho-Finamore et al., 2011). Porém, não sabemos se o mesmo poderia ocorrer em *L. braziliensis*. Em trabalho anterior de nosso grupo (Soares et al., 2005) foi descrito que o LPG da cepa M2903 não apresenta cadeias laterais em suas unidades repetitivas nas formas procíclicas. Nas formas estacionárias e metacíclicas ocorre adição de um ou dois resíduos de β -glicose. No nosso trabalho, nos ensaios de dot-blot, os LPGs foram devidamente purificados e reconhecidos pelo anticorpo CA7AE que reconhece os epítomos conservados de Gal-Man-PO₄ comuns a todos LPGs. A fim de se detectar polimorfismos nas unidades repetitivas, os LPGs radioativos das cepas M2903 (controle), RR051 (típica) e M15991 (muco-cutânea) foram despolimerizados, tratados com fosfatase alcalina, dessalinizados e submetidos à cromatografia de camada fina. A utilização de LPGs radiomarcados com [6-³H]-galactose foi devido ao fato de que *L. braziliensis* produz menor quantidade deste

glicoconjugado do que as outras espécies (Soares et al., 2005). Isso possibilitou a aplicação de uma técnica mais sensível ao invés de utilizarmos as análises químicas rotineiras de glicobiologia (Soares et al., 2002; 2004; Nogueira et al., 2016). Os resultados indicaram polimorfismos evidentes nas unidades repetitivas. Por exemplo, o LPG da cepa M2903 confirmou a existência de di-, tri- e tetrassacarídeos conforme descrito anteriormente (Soares et al., 2005). Para a cepa RR051 foram observados picos contendo tetra- e dissacarídeos, enquanto que para a cepa M15991 foram observadas apenas dissacarídeos. Entretanto, não sabemos quais açúcares poderiam estar presentes na cepa RR051 e iremos investigar através de tratamentos enzimáticos com β -glicosidases e β -galactosidases. Estes resultados comprovam a existência de variações qualitativas nas unidades repetitivas e sugerem que estas diferenças poderiam afetar a capacidade funcional dos LPGs sobre os macrófagos. Esta parte de caracterização se continuará com as três outras cepas/isolados como perspectiva deste trabalho e para a conclusão final da publicação.

Nos experimentos anteriores, testamos o papel do LPG (e prováveis polimorfismos) na ativação extracelular de macrófagos. Nosso próximo passo agora, foi avaliar o papel dos LPGs e respectivos parasitos intracelularmente nos compartimentos fagossomais. Visto que os fagossomas desempenham um papel fundamental na imunidade inata e adaptativa, as propriedades funcionais dessas organelas e os mecanismos moleculares que regulam suas interações com patógenos tem sido de grande interesse para a pesquisa nos últimos anos (Descoteaux et al., 2014; Desjardins and Descoteaux, 1997). Logo no início da infecção, após as promastigotas serem inoculadas no hospedeiro, os parasitas são rapidamente internalizados por fagócitos que são recrutados na pele incluindo neutrófilos, monócitos e macrófagos (Nathan C Peters and Sacks, 2009; Rogers, 2012; Sacks and Kamhawi, 2001). Com base nos ensaios de infectividades, todas as cepas/isolados, exceto RR410 (cepa atípica com perfil genético atípico) infectaram muito bem os macrófagos derivados da medula óssea. Esta cepa apresentou um perfil de infectividade semelhante ao de *L. donovani* (LV9), nossa cepa controle. Considerando que todas as cepas infectaram com sucesso os macrófagos, iniciamos os experimentos com marcadores específicos de fagocitose (LAMP-1) e acidificação (lysotracker) (Vinet et al., 2009). Sabe-se que o LPG está envolvido na sobrevivência da *Leishmania* dentro do vacúolo parasitóforo (Descoteaux & Turco, 1999). Devido à suas propriedades hidrofóbicas, ele se insere na membrana de fagossoma e desestabiliza os microdomínios lipídicos (Dermine et al., 2005), prejudicando os processos necessários para a

geração de um compartimento microbicida dentro dos macrófagos. A consequência da desorganização desse microdomínios mediada pelo LPG é a exclusão do regulador de fusão de membrana, a synaptotagmin V (Syt V) do fagolisossoma após a infecção. Isto conseqüentemente anulará o recrutamento da V-ATPase e impedirá a acidificação do fagolisossoma (Collins et al., 2002; Vinet et al., 2009). Para avaliar o papel isolado deste glicoconjugado, nós o acoplamos a partículas de zimosan. Não observamos diferenças na fagocitose (mobilização de LAMP-1) quando utilizamos estas partículas cobertas com os diferentes tipos de LPG dos isolados/cepas de *L. braziliensis*. Estes resultados sugerem que durante a fagocitose, outras moléculas/fatores do parasito podem estar envolvidas. A fim de se detectar estas diferenças, partimos para a internalização dos parasitos inteiros das diferentes cepas/isolados.

Diversos estudos têm demonstrado uma gama de estratégias moleculares utilizadas por microorganismos para interferir com a maturação de fagosomas em fagolisossomas, processo denominado de biogênese de fagolisossomas (Alix et al., 2011; Flannagan et al., 2009). A biogênese do fagolisossoma é essencial para a aquisição de propriedades microbicidas necessárias para a morte de patógenos (Desjardins et al., 2005; Jutras and Desjardins, 2005). A *Leishmania* parasita células fagocíticas e provoca a inibição da biogênese do fagolisossoma. Esta é uma maneira eficiente do parasito criar um nicho intracelular favorável para o estabelecimento da infecção (Desjardins e Descoteaux, 1997). A maioria dos trabalhos com as vias de LAMP-1, lysotracker, e complexos NADPH utilizaram como modelo *L. donovani* e *L. major*. As promastigotas internalizadas em fagolisossomas irão causar uma má interação de endossomas resultando num recrutamento tardio de LAMP-1 (Dermine et al., 2000; Scianimanico et al., 1999; Spath et al., 2003). Em nossos resultados, após 24 horas de infecção, as cepas/isolados apresentaram um perfil diferencial de mobilização de LAMP-1 nos fagolisossomos. As cepas/isolados com perfil genético atípico (RR418 e RR410) e típica M2903 recrutaram menos LAMP-1 do que as cepas (RR051) e de vetor (M8401). É interessante ressaltar que o comportamento das cepas atípicas foi semelhante ao de *L. donovani*, que sabidamente retarda a fagocitose em macrófagos (Vinet et al., 2009). Por outro lado, quando avaliamos a acidificação do fagolisossoma (lysotracker), todas as cepas típicas, atípicas e de vetor acidificaram mais do que a cepa muco-cutânea. Estes resultados com conjunto com os de LAMP-1 não permitiram realizar uma correlação direta entre forma clínica e biogênese dos fagolisossomo. Tudo indica que o parasito dependendo da

cepa/isolado é capaz de orquestrar uma resposta imune multifatorial provavelmente cepa-específica.

Finalmente, sabe-se que a GP63 é uma proteína importante que atua na acidificação do fagolisossomo (Chaudhuri et al., 1989; Matheoud et al., 2013). A GP63 é internalizada em grande parte através de microdomínios lipídicos, que leva a clivagem e estimulação da fosfatase de algumas proteínas podendo atenuar as funções microbicidas dos macrófagos (Braun et al., 2004). A fim de se avaliar a proporção dos diferentes glicoconjugados nos parasitos inteiros, estes foram lisados e submetidos ao western-blot para avaliar a expressão de LPG e GP63. Foram observadas diferenças significativas em cada cepa. Interessante observar que mesmo a alta expressão de GP63 não foi correlacionada a uma maior atividade proteolítica. Porém, as cepas M2903, RR418 e M8401 que apresentaram maior atividade proteolítica resultaram em uma maior acidificação do fagolisossoma nos ensaios com lysotracker. Trabalhos recentes mostraram que a GP63 de *L. braziliensis* se encontra no cromossomo 10 e que cepas isoladas de diferentes formas clínicas numa mesma região possuem domínios conservados e polimorfismos específicos em seus sítios catalíticos (Medina et al., 2016; Sutter et al., 2017). Neste contexto, esta variabilidade poderia resultar em diferentes padrões de virulência nesta espécie. Nossos resultados confirmam estes achados, uma vez que o perfil e a expressão da GP63 nas diferentes cepas foram variáveis. Portanto, o melhor conhecimento de GP63 em *L. braziliensis* faz-se necessário para se entender suas estratégias de escape.

Nosso estudo demonstrou que diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis* apresentaram comportamentos distintos nos vários parâmetros estudados. Elas induziram diferentes respostas em células do hospedeiro vertebrado não só extracelularmente quanto intracelularmente. Ao se investigar o papel de glicoconjugados isolados ou nos parasitos, foi observada uma correlação entre maior atividade proteolítica da GP63 e acidificação do fagolisossomo. Entretanto, o papel do LPG isolado parece ter sido importante apenas extracelularmente. O processo de interação *Leishmania*-macrófago é um processo complexo que envolve não só moléculas do parasito como da célula hospedeira (Bogdan and Röllinghoff, 1998). Todos estes componentes atuam em conjunto para o desfecho da imunopatologia das diferentes formas clínicas da *L. braziliensis*.

7. Conclusões

- A produção de NO e citocinas pró-inflamatórias pelos LPGs das diferentes cepas/isolados de *L. braziliensis* foi variável e preferencialmente via TLR4;
- Os LPGs dos isolados de *L. braziliensis* com perfil genético atípico foram mais pró-inflamatórios, enquanto que o da cepa muco-cutânea foi menos pró-inflamatório;
- Partículas de zimosan cobertas por LPG não são capazes de mobilizar LAMP-1;
- Os parasitos inteiros das cepas/isolados de *L. braziliensis* inibem diferencialmente o recrutamento de LAMP-1 e a acidificação em fagolisossomas;
- A expressão de GP63 e LPG nos parasitos foi variável, sendo que não foi observada correlação com a atividade proteolítica;
- A atividade proteolítica da GP63 foi correlacionada com uma maior acidificação do fagolisossoma;
- A caracterização preliminar das estruturas do LPG demonstrou alguns polimorfismos nas cepas M2903, RR051 e M15991.

REFERÊNCIAS

- Aderem, A., 2003. Phagocytosis and the Inflammatory Response. *J. Infect. Dis.* 187, S340–S345.
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., Sereno, D., 2016. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis.*
- Alix, E., Mukherjee, S., Roy, C.R., 2011. Subversion of membrane transport pathways by vacuolar pathogens. *J. Cell Biol.*
- Álvarez de Celis, H., Gómez, C.P., Descoteaux, A., Duplay, P., 2015. Dok proteins are recruited to the phagosome and degraded in a GP63-dependent manner during *Leishmania major* infection. *Microbes Infect.* 17, 285–294.
- Arango Duque, G., Fukuda, M., Descoteaux, A., 2013. Synaptotagmin XI regulates phagocytosis and cytokine secretion in macrophages. *J. Immunol.* 190, 1737–45.
- Assis, R.R., Ibraim, I.C., Noronha, F.S., Turco, S.J., Soares, R.P., 2012. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: Modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, 1–11.
- Bacellar, O., Lessa, H., Schriefer, A., Machado, P., De Jesus, A.R., Dutra, W.O., Gollob, K.J., Carvalho, E.M., 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect. Immun.* 70, 6734–6740.
- Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L.G., Ruiz, A., Cervantes, R., Torres, A.P., 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.

Boaventura, V.S., Santos, C.S., Cardoso, C.R., De Andrade, J., Dos Santos, W.L.C., Clarêncio, J., Silva, J.S., Borges, V.M., Barral-Netto, M., Brodskyn, C.I., Barral, A., 2010. Human mucosal leishmaniasis: Neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur. J. Immunol.* 40, 2830–2836.

Bogdan, C., Röllinghoff, M., 1998. The immune response to *Leishmania*: Mechanisms of parasite control and evasion, in: *International Journal for Parasitology*. pp. 121–134.

Braun, V., Fraissier, V., Raposo, G., Hurbain, I., Sibarita, J.B., Chavrier, P., Galli, T., Niedergang, F., 2004. TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonised particles in macrophages. *EMBO J.* 23, 4166–4176.

Braun, V., Niedergang, F., 2006. Linking exocytosis and endocytosis during phagocytosis. *Biol. Cell* 98, 195–201.

Brittingham, A., Mosser, D., 1996. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol. Today*.

Carvalho, L.P., Passos, S., Bacellar, O., Lessa, M., Almeida, R.P., Magalhães, A., Dutra, W.O., Gollob, K.J., Machado, P., Ribeiro De Jesus, A., 2007. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol.* 29, 251–258.

Casgrain, P.A., Martel, C., McMaster, W.R., Mottram, J.C., Olivier, M., Descoteaux, A., 2016. Cysteine Peptidase B Regulates *Leishmania mexicana* Virulence through the Modulation of GP63 Expression. *PLoS Pathog.* 12, 1–17.

Castellucci, L., Jamieson, S.E., Almeida, L., Oliveira, J., Guimarães, L.H., Lessa, M., Fakiola, M., Jesus, A.R. de, Nancy Miller, E., Carvalho, E.M., Blackwell, J.M., 2012. Wound healing genes and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 12, 1102–1110.

Castellucci, L., Menezes, E., Oliveira, J., Magalhaes, a, Guimaraes, L.H., Lessa, M., Ribeiro, S., Reale, J., Noronha, E.F., Wilson, M.E., Duggal, P., Beaty, T.H., Jeronimo, S., Jamieson, S.E., Bales, a, Blackwell, J.M., de Jesus, a R., Carvalho, E.M., 2006. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *J Infect Dis* 194, 519–527.

Chaudhuri, G., Chaudhuri, M., Pan, A., Chang, K.P., 1989. Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *J. Biol. Chem.* 264, 7483–7489.

Coelho-Finamore, J.M., Freitas, V.C., Assis, R.R., Melo, M.N., Novozhilova, N., Secundino, N.F., Pimenta, P.F., Turco, S.J., Soares, R.P., 2011. *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. *Int. J. Parasitol.* 41, 333–342.

Collins, R.F., Schreiber, A.D., Grinstein, S., Trimble, W.S., 2002. Syntaxins 13 and 7 Function at Distinct Steps During Phagocytosis. *J. Immunol.* 169, 3250–3256.

Costa-Silva, M.F., Gomes, L.I., Martins-Filho, O.A., Rodrigues-Silva, R., Freire, J. de M., Quaresma, P.F., Pascoal-Xavier, M.A., Mendes, T.A. de O., Serakides, R., Zauli, D.A.G., Campi-Azevedo, A.C., Melo, M.N., Gontijo, C.M.F., Peruhype-Magalhães, V., Teixeira-Carvalho, A., 2014. Gene expression profile of cytokines and chemokines in skin lesions from Brazilian Indians with localized cutaneous leishmaniasis. *Mol. Immunol.* 57, 74–85.

Courret, N., Fréhel, C., Gouhier, N., Pouchelet, M., Prina, E., Roux, P., Antoine, J.-C., 2002. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J. Cell Sci.* 115, 2303–16.

Czibener, C., Sherer, N.M., Becker, S.M., Pypaert, M., Hui, E., Chapman, E.R., Mothes, W., Andrews, N.W., 2006. Ca²⁺ and synaptotagmin VII-dependent delivery of lysosomal membrane to nascent phagosomes. *J. Cell Biol.* 174, 997–1007.

d'Avila-Levy, C.M., Altoé, E.C.F., Uehara, L.A., Branquinha, M.H., Santos, A.L.S., 2014.

GP63 function in the interaction of trypanosomatids with the invertebrate host: Facts and prospects. *Subcell. Biochem.* 74, 253–270.

De Assis, R.R., Ibraim, I.C., Nogueira, P.M., Soares, R.P., Turco, S.J., 2012. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1820, 1354–1365.

de Carvalho Vivarini, A., Pereira, R. d. M.S., Dias Teixeira, K.L., Calegari-Silva, T.C., Bellio, M., Laurenti, M.D., Corbett, C.E.P., de Castro Gomes, C.M., Soares, R.P., Silva, A.M., Silveira, F.T., Lopes, U.G., 2011. Human cutaneous leishmaniasis: interferon-dependent expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) via TLR2. *FASEB J.* 25, 4162–4173.

de Veer, M.J., Curtis, J.M., Baldwin, T.M., DiDonato, J.A., Sexton, A., McConville, M.J., 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.

Dermine, J.F., Goyette, G., Houde, M., Turco, S.J., Desjardins, M., 2005. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. *Cell. Microbiol.* 7, 1263–1270.

Dermine, J.F., 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., Duque, G.A., Descoteaux, A., 2014. Macrophage Cytokines⁵⁰¹ Involvement in Immunity and Infectious Diseases Macrophage cytokines⁵⁰¹ involvement in immunity and infectious diseases.

Descoteaux, A., Turco, S.J., 2002. Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microbes Infect.*

Descoteaux, A., Turco, S.J., 1999. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1455, 341–352.

Desjardins, M., Descoteaux, A., 1997. Inhibition of Phagolysosomal Biogenesis by the *Leishmania* Lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 185, 2061–2068.

Desjardins, M., Griffiths, G., 2003. Phagocytosis: Latex leads the way. *Curr. Opin. Cell Biol.*

Desjardins, M., Houde, M., Gagnon, E., 2005. Phagocytosis: The convoluted way from nutrition to adaptive immunity. *Immunol. Rev.*

Díaz, N.L., Fernández, M., Figueira, E., Ramírez, R., Monsalve, I.B., Tapia, F.J., 2003. Nitric oxide and cellular immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.* 28, 288–293.

Dobson, D.E., Mengeling, B.J., Cilmi, S., Hickerson, S., Turco, S.J., Beverley, S.M., 2003. Identification of genes encoding arabinosyltransferases (SCA) mediating developmental modifications of lipophosphoglycan required for sand fly transmission of *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* 278, 28840–28848.

Espinosa, O.A., Serrano, M.G., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G., Shaw, J.J., 2016. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology* 1–13.

Faria, D.R., Gollob, K.J., Barbosa, J., Schriefer, A., Machado, P.R.L., Lessa, H., Carvalho, L.P., Romano-Silva, M.A., De Jesus, A.R., Carvalho, E.M., Dutra, W.O., 2005. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect. Immun.* 73, 7853–7859.

Feng, G., Goodridge, H.S., Harnett, M.M., Wei, X., Nikolaev, A. V, Higson, A.P., Liew, F., 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.

Flandin, J.F., Chano, F., Descoteaux, A., 2006. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon- γ -primed macrophages. *Eur. J. Immunol.* 36, 411–420.

Flannagan, R.S., Cosío, G., Grinstein, S., 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat. Rev. Microbiol.*

Garcia, L., Kindt, A., Bermudez, H., Llanos-Cuentas, A., De Doncker, S., Arevalo, J., Tintaya, K.W.Q., Dujardin, J.C., 2004. Culture-Independent Species Typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2294–2297.

Gazzinelli, R.T., Denkers, E.Y., 2006. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: Implications for host parasitism. *Nat. Rev. Immunol.*

Green, S.J., Crawford, R.M., Hockmeyer, J.T., Meltzer, M.S., Nacy, C.A., 1990. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in INF- γ -stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.* 90, 4290–4297.

Grimaldi, G., Tesh, R.B., McMahonpratt, D., 1989. A review of the geographic-distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new-world. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41, 687–725.

Guimarães, L.H., Machado, P.R.L., Lago, E.L., Morgan, D.J., Schriefer, A., Bacellar, O., Carvalho, E.M., 2009. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 712–715.

Guimarães, L.H., Queiroz, A., Silva, J.A., Silva, S.C., Magalhães, V., Lago, E.L., Machado, P.R.L., Bacellar, O., Wilson, M.E., Beverley, S.M., Carvalho, E.M., Schriefer, A., 2016a. Atypical Manifestations of Cutaneous Leishmaniasis in a Region Endemic for *Leishmania*

braziliensis: Clinical, Immunological and Parasitological Aspects. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–14.

Guimarães, L.H., Queiroz, A., Silva, J.A., Silva, S.C., Magalhães, V., Lago, E.L., Machado, P.R.L., Bacellar, O., Wilson, M.E., Beverley, S.M., Carvalho, E.M., Schriefer, A., 2016b. Atypical Manifestations of Cutaneous Leishmaniasis in a Region Endemic for *Leishmania braziliensis*: Clinical, Immunological and Parasitological Aspects. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10.

Gupta, G., Oghumu, S., Satoskar, A.R., 2013. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. *Adv. Appl. Microbiol.* 82, 155–184.

Horta, M.F., Mendes, B.P., Roma, E.H., Noronha, F.S.M., MacDo, J.P., Oliveira, L.S., Duarte, M.M., Vieira, L.Q., 2012. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *J. Parasitol. Res.*

Ibraim, I.C., De Assis, R.R., Pessoa, N.L., Campos, M.A., Melo, M.N., Turco, S.J., Soares, R.P., 2013. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasites and Vectors* 6, 1–11.

Ilg, T., Stierhof, Y.D., Craik, D., Simpson, R., Handman, E., Bacic, a, 1996. Purification and structural characterization of a filamentous, mucin-like proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* parasites. *J. Biol. Chem.* 271, 21583–96.

Isnard, A., Shio, M.T., Olivier, M., 2012. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2.

Ives, A., Ronet, C., Prevel, F., Ruzzante, G., Fuertes-Marraco, S., Schutz, F., Zangger, H., Revaz-Breton, M., Lye, L.F., Hickerson, S.M., Beverley, S.M., Acha-Orbea, H., Launois, P., Fasel, N., Masina, S., 2011. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science* (80-.). 331, 775–778.

Jutras, I., Desjardins, M., 2005. PHAGOCYTOSIS: At the Crossroads of Innate and Adaptive

Immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 511–527.

Kaye, P., Scott, P., 2011. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.*

Lainson, R., Shaw, J.J., 1987. Evolution, classification and geographical distribution, in: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Volume I. Biology and Epidemiology.* p. 120.

Leite, P.M., Gomes, R.S., Figueiredo, A.B., Serafim, T.D., Tafuri, W.L., de Souza, C.C., Moura, S.A.L., Fietto, J.L.R., Melo, M.N., Ribeiro-Dias, F., Oliveira, M.A.P., Rabello, A., Afonso, L.C.C., 2012. Ecto-Nucleotidase Activities of Promastigotes from *Leishmania (Viannia) braziliensis* Relates to Parasite Infectivity and Disease Clinical Outcome. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6.

Lieke, T., Nylén, S., Eidsmo, L., McMaster, W.R., Mohammadi, A.M., Khamesipour, A., Berg, L., Akuffo, H., 2008. *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clin. Exp. Immunol.* 153, 221–230.

Lima, J.B., Araújo-santos, T., Lázaro-souza, M., Brito, A., Coimbra, I., Jesus-santos, F.H., Luz, N.F., Pontes, D.M., Entringer, P.F., Descoteaux, A., Bozza, P.T., 2017a. lipophosphoglycan induced- Prostaglandin E 2 production in association with PPAR- γ expression via activation of Toll like receptors-1 and 2 1–11.

Lima, J.B., Araújo-Santos, T., Lázaro-Souza, M., Carneiro, A.B., Ibraim, I.C., Jesus-Santos, F.H., Luz, N.F., Pontes, S.D.M., Entringer, P.F., Descoteaux, A., Bozza, P.T., Soares, R.P., Borges, V.M., 2017b. *Leishmania infantum* lipophosphoglycan induced-Prostaglandin E2 production in association with PPAR- γ expression via activation of Toll like receptors-1 and 2. *Sci. Rep.* 7.

Lodge, R., Diallo, T.O., Descoteaux, A., 2006. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell. Microbiol.* 8, 1922–1931.

Luz, N.F., Andrade, B.B., Feijo, D.F., Araujo-Santos, T., Carvalho, G.Q., Andrade, D., Abanades, D.R., Melo, E. V., Silva, A.M., Brodskyn, C.I., Barral-Netto, M., Barral, A., Soares, R.P., Almeida, R.P., Bozza, M.T., Borges, V.M., 2012. Heme Oxygenase-1 Promotes the Persistence of *Leishmania chagasi* Infection. *J. Immunol.* 188, 4460–4467.

Macedo, D.H., Menezes-Neto, A., Rugani, J.M., Rocha, A.C., Silva, S.O., Melo, M.N., Lye, L.F., Beverley, S.M., Gontijo, C.M., Soares, R.P., 2016. Low frequency of LRV1 in *Leishmania braziliensis* strains isolated from typical and atypical lesions in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mol. Biochem. Parasitol.* 210, 50–54.

Mahoney, A.B., Sacks, D.L., Saraiva, E., Modi, G., Turco, S.J., 1999. Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani* - Sand fly interactions. *Biochemistry* 38, 9813–9823.

Marco, J.D., Barroso, P.A., Locatelli, F.M., Cajal, S.P., Hoyos, C.L., Nevot, M.C., Lauthier, J.J., Tomasini, N., Juarez, M., Estévez, J.O., Korenaga, M., Nasser, J.R., Hashiguchi, Y., Ruybal, P., 2015. Multilocus sequence typing approach for a broader range of species of *Leishmania* genus: Describing parasite diversity in Argentina. *Infect. Genet. Evol.* 30, 308–317.

Matheoud, D., Moradin, N., Bellemare-Pelletier, A., Shio, M.T., Hong, W.J., Olivier, M., Gagnon, É., Desjardins, M., Descoteaux, A., 2013. *Leishmania* evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. *Cell Host Microbe* 14, 15–25.

Matte, C., Descoteaux, A., 2010. *Leishmania donovani* amastigotes impair gamma interferon-induced STAT1 nuclear translocation by blocking the interaction between STAT1 and importin- β . *Infect. Immun.* 78, 3736–3743.

Medina, L.S., Souza, B.A., Queiroz, A., Guimarães, L.H., Machado, P.R.L., Carvalho, E.M., Wilson, M.E., Schriefer, A., 2016. The gp63 gene cluster is highly polymorphic in natural *Leishmania (viannia) braziliensis* populations, but functional sites are conserved. *PLoS One* 11.

Meireles, C.B., Maia, L.C., Soares, G.C., Teodoro, I.P.P., Gadelha, M. do S.V., da Silva, C.G.L., de Lima, M.A.P., 2017. Atypical presentations of cutaneous leishmaniasis: A systematic review. *Acta Trop.*

Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.*

Mosser, D.M., Rosenthal, L.A., 1993. Leishmania-macrophage interactions: Multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin. Cell Dev. Biol.* 4, 315–322.

Mul, F.P., Zuurbier, A.E., Janssen, H., Calafat, J., van Wetering, S., Hiemstra, P.S., Roos, D., Hordijk, P.L., 2000. Sequential migration of neutrophils across monolayers of endothelial and epithelial cells. *J. Leukoc. Biol.* 68, 529–37.

Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdts, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F.O., Mege, J.L., Mosser, D.M., Natoli, G., Saeij, J.P., Schultze, J.L., Shirey, K.A., Sica, A., Suttles, J., Udalova, I., vanGinderachter, J.A., Vogel, S.N., Wynn, T.A., 2014. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* 41, 14–20.

Ng Yan Hing, J.D., Desjardins, M., Descoteaux, A., 2004. Proteomic analysis reveals a role for protein kinase C- α in phagosome maturation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 810–816.

Niedergang, F., Chavrier, P., 2004. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: Many roads lead to the phago(s)ome. *Curr. Opin. Cell Biol.*

Nogueira, P.M., Assis, R.R., Torrecilhas, A.C., Saraiva, E.M., Pessoa, N.L., Campos, M.A., Marialva, E.F., Ríos-Velasquez, C.M., Pessoa, F.A., Secundino, N.F., Rugani, J.N., Nieves, E., Turco, S.J., Melo, M.N., Soares, R.P., 2016. Lipophosphoglycans from *Leishmania amazonensis* Strains Display Immunomodulatory Properties via TLR4 and Do Not Affect Sand Fly Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–17.

Nogueira, P.M., Guimarães, A.C., Assis, R.R., Sadlova, J., Myskova, J., Pruzinova, K., Hlavackova, J., Turco, S.J., Torrecilhas, A.C., Volf, P., Soares, R.P., 2017. Lipophosphoglycan polymorphisms do not affect *Leishmania amazonensis* development in the permissive vectors *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis*. *Parasites and Vectors* 10.

Olivier, M., Atayde, V.D., Isnard, A., Hassani, K., Shio, M.T., 2012. *Leishmania* virulence factors: Focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect.* 14, 1377–1389.

Orlandi, P.A., Turco, S.J., 1987. Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J. Biol. Chem.* 262, 10384–10391.

Osorio y Fortéa, J., de La Llave, E., Regnault, B., Coppée, J.Y., Milon, G., Lang, T., Prina, E., 2009. Transcriptional signatures of BALB/c mouse macrophages housing multiplying *Leishmania amazonensis* amastigotes. *BMC Genomics* 10, 1–11.

Paranaíba, L.F., De Assis, R.R., Nogueira, P.M., Torrecilhas, A.C., Campos, J.H., Silveira, A.C.D.O., Martins-Filho, O.A., Pessoa, N.L., Campos, M.A., Parreiras, P.M., Melo, M.N., Gontijo, N.D.F., Soares, R.P.P., 2015. *Leishmania enriettii*: Biochemical characterisation of lipophosphoglycans (LPGs) and glycoinositolphospholipids (GIPLs) and infectivity to *Cavia porcellus*. *Parasites and Vectors* 8, 1–14.

Paranaíba, L.F., Pinheiro, L.J., Macedo, D.H., Menezes-Neto, A., Torrecilhas, A.C., Tafuri, W.L., Soares, R.P., 2017a. An overview on *Leishmania* (*Mundinia*) *enriettii*: biology, immunopathology, LRV and extracellular vesicles during the host–parasite interaction. *Parasitology* 1–9.

Paranaíba, L.F., Pinheiro, L.J., Torrecilhas, A.C., Macedo, D.H., Menezes-Neto, A., Tafuri, W.L., Soares, R.P., 2017b. *Leishmania enriettii* (Muniz & Medina, 1948): A highly diverse parasite is here to stay. *PLoS Pathog.*

Peters, N.C., Sacks, D.L., 2009. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell. Microbiol.*

Peters, N.C., Sacks, D.L., 2009. Microreview The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis 11, 1290–1296.

Proudfoot, L., Nikolaev, A. V, Feng, G.J., Wei, X.Q., Ferguson, M.A.J., Brimacombe, J.S., Liew, F.Y., 1996. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10984–10989.

Quaresma, P.F., Ferreira, C., Brito, A. De, Marteleto, J., Rugani, N., Freire, J.D.M., Baptista, R.D.P., Moreno, E.C., Gontijo, R.C., Rego, F.D., Diniz, J.E., Melo, M.N., Maria, C., Gontijo, F., 2018. Distinct genetic profiles of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* associate with clinical variations in cutaneous-leishmaniasis patients from an endemic area in Brazil.

Queiroz, A., Sousa, R., Heine, C., Cardoso, M., Guimarães, L.H., Machado, P.R.L., Carvalho, E.M., Riley, L.W., Wilson, M.E., Schriefer, A., 2012. Association between an emerging disseminated form of leishmaniasis and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* strain polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 50, 4028–4034.

Rogers, M.E., 2012. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Front. Microbiol.* 3.

Sacks, D., Kamhawi, S., 2001. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 453–483.

Sacks, D.L., 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.

Sallusto, F., Zielinski, C.E., Lanzavecchia, A., 2012. Human Th17 subsets. *Eur. J. Immunol.*

Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermonprez, P., Vargas, P., Moura, I.C., Lennon-Duménil, A.M., Seabra, M.C., Raposo, G., Amigorena, S., 2006. NOX2 Controls Phagosomal pH to Regulate Antigen Processing during Crosspresentation by Dendritic Cells. *Cell* 126,

205–218.

Scianimanico, S., Desrosiers, M., Dermine, J.F., Méresse, S., Descoteaux, A., Desjardins, M., 1999. Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cell. Microbiol.* 1, 19–32.

Séguin, O., Descoteaux, A., 2016. *Leishmania*, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. *Cell. Immunol.* 309, 1–6.

Sindrilaru, A., Peters, T., Wieschalka, S., Baican, C., Baican, A., Peter, H., Hainzl, A., Schatz, S., Qi, Y., Schlecht, A., Weiss, J.M., Wlaschek, M., Sunderkötter, C., Scharffetter-kochanek, K., 2011. " O Vosftusbjofe Qspjogmbnbnbupsz . Nbdspqibhf Qpqvmbujpo Jovdfe Cz Jspo 121, 985–997.

Soares, R.P.P., Barron, T., McCoy-Simandle, K., Svobodova, M., Warburg, A., Turco, S.J., 2004. *Leishmania tropica*: Intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by different *Phlebotomus* species. *Exp. Parasitol.* 107, 105–114.

Soares, R.P.P., Cardoso, T.L., Barron, T., Araújo, M.S.S., Pimenta, P.F.P., Turco, S.J., 2005. *Leishmania braziliensis*: A novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *Int. J. Parasitol.* 35, 245–253.

Souza, M.A., Castro, M.C.A.B., Oliveira, A.P., Almeida, A.F., Reis, L.C., Silva, C.J., Brito, M.E.F., Pereira, V.R.A., 2012. American tegumentary leishmaniasis: Cytokines and nitric oxide in active disease and after clinical cure, with or without chemotherapy. *Scand. J. Immunol.* 76, 175–180.

Spath, G.F., Garraway, L.A., Turco, S.J., Beverley, S.M., 2003. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 9536–9541.

Sterkers, Y., Lachaud, L., Bourgeois, N., Crobu, L., Bastien, P., Pagès, M., 2012. Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: Mosaic aneuploidy in *Leishmania*. *Mol.*

Microbiol.

Stuart, L.M., Ezekowitz, R.A.B., 2005. Phagocytosis: Elegant complexity. *Immunity*.

Sutter, A., Antunes, D., Silva-Almeida, M., De Souza Costa, M.G., Caffarena, E.R., 2017. Structural insights into leishmanolysins encoded on chromosome 10 of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112, 617–625.

Tavares, N.M., Araújo-Santos, T., Afonso, L., Nogueira, P.M., Lopes, U.G., Soares, R.P., Bozza, P.T., Bandeira-Melo, C., Borges, V.M., Brodskyn, C., 2014. Understanding the Mechanisms Controlling *Leishmania amazonensis* Infection In Vitro: The Role of LTB4 Derived From Human Neutrophils. *J. Infect. Dis.* 210, 656–666.

Trinchieri, G., Sher, A., 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.*

Turco, S.J., Descoteaux, A., 1992. THE LIPOPHOSPHOGLYCAN OF LEISHMANIA PARASITES. *Annu. Rev. Microbiol* 46, 65–94.

Vargas-Inchaustegui, D.A., Tai, W., Xin, L., Hogg, A.E., Corry, D.B., Soong, L., 2009. Distinct roles for MyD88 and toll-like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice. *Infect. Immun.* 77, 2948–2956.

VIEIRA, O. V., BOTELHO, R.J., GRINSTEIN, S., 2002. Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem. J.* 366, 689–704.

Vinet, A.F., Fukuda, M., Descoteaux, A., 2008. The Exocytosis Regulator Synaptotagmin V Controls Phagocytosis in Macrophages. *J. Immunol.* 181, 5289–5295.

Vinet, A.F., Fukuda, M., Turco, S.J., Descoteaux, A., 2009. The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of Synaptotagmin V. *PLoS Pathog.* 5.

Vinet, A.F., Jananji, S., Turco, S.J., Fukuda, M., Descoteaux, A., 2011. Exclusion of synaptotagmin V at the phagocytic cup by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan results in decreased promastigote internalization. *Microbiology* 157, 2619–2628.

Winberg, M.E., Holm, Å., Särndahl, E., Vinet, A.F., Descoteaux, A., Magnusson, K.E., Rasmusson, B., Lerm, M., 2009. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan inhibits phagosomal maturation via action on membrane rafts. *Microbes Infect.* 11, 215–222.

Young, D.G., Duncan, M.A., 1994. Guide of the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* Sand Flies in Mexico, West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem. Am. Entomol. Inst.* 54, 1–881. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>