

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

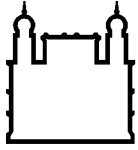
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Leishmania (Leishmania) amazonensis: Participação de fatores do hospedeiro e do parasito no curso da infecção experimental em camundongos.

BERNARDO ACÁCIO SANTINI PEREIRA

Rio de Janeiro
2010



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

BERNARDO ACÁCIO SANTINI PEREIRA

Leishmania (Leishmania) amazonensis: Participação de fatores do hospedeiro e do parasito no curso da infecção experimental em camundongos.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Parasitária

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Alves

RIO DE JANEIRO

2010

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

P436

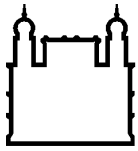
Pereira, Bernardo Acácio Santini.

Leishmania (Leishmania) amazonensis : participação de fatores do hospedeiro e do parasito no curso da infecção experimental em camundongos / Bernardo Acácio Santini Pereira. – Rio de Janeiro, 2010. xviii, 119 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2010.
Bibliografia: f. 98-118

1. Leishmania (Leishmaniose) amazonensis. 2. Interação parasito-hospedeiro. 3. Cisteína-proteinase. 4. BALB/C. 5. CBA. I. Título.

CDD 616.9364



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: BERNARDO ACÁCIO SANTINI PEREIRA

Leishmania (Leishmania) amazonensis: **Participação de fatores do hospedeiro e do parasito no curso da infecção experimental em camundongos.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Roberto Alves

Aprovada em: ____ / ____ / ____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Sergio Coutinho Furtado de Mendonça (Presidente)
Prof^a. Dr^a. Kátia da Silva Calabrese (Revisora e Membro)
Prof^a. Dr^a. Helena Carla Castro (Membro)
Prof^a. Dr^a. Alda Maria Da Cruz (Suplente)
Prof^a. Dr^a. Elvira Maria Saraiva Chequer Bou Habib (Suplente)

Rio de Janeiro, 17 de Maio de 2010

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Doenças
Endêmicas do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.

DEDICATÓRIA

Esse trabalho é dedicado à minha namorada,
Alexandra, aos meus pais e meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Carlos, que sempre acreditou em mim e me apoiou desde o começo. Foi um orientador no melhor sentido da palavra, propondo idéias e demandando resultados e respostas, mas sempre com respeito e liberdade de pensamento, permitindo que eu caminhasse com as minhas próprias pernas. E, além de um orientador, tornou-se um grande e verdadeiro amigo.

Às agências de fomento e fontes de financiamento, cujo apoio permitiu a realização desse estudo: PAPES IV (Fiocruz/CNPq) e FAPERJ, e à CAPES pela bolsa de doutorado.

A todos os integrantes da Banca: membros, suplentes e revisora, pelas ótimas sugestões de aprimoramento da qualidade desse trabalho e pelo inestimável debate científico.

À chefe do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas (LABIMDOE), Dra. Constança, e aos demais pesquisadores do laboratório, Dra. Cláudia, Dr. Otacílio e Dr. José, pelo apoio e amizade.

Aos funcionários do LABIMDOE e meus grandes amigos, Luzia, Angélica e Vitor, que foram imprescindíveis para a realização desse trabalho, me ajudando sempre em tudo.

A todos os estudantes e bolsistas do LABIMDOE (atuais, do passado e do futuro), Daniela, Francisco, Fabiano, Karina, Brunno, Luiz, Gabriel, Thais, Ellen, Bianca, Livia Santos, Lívia Uehara, Larissa, Leonardo, André, Camila, Cristiane, Ana Carolina, Clara, Myllena, Lívia Reis, Louise, Tainah, Raquel, Marianna, Lenilton, Rennan, Thaiene, Raisal, Geisica e, de modo especial, ao Franklin, por toda a ajuda durante a realização desse trabalho e pela amizade e diversão.

Aos colaboradores dos demais laboratórios do IOC/Fiocruz: Dra. Yara Traub-Cseko, Dr. Marcel Marin, Ana Bahia, Erich, Dr. Álvaro Bertho, Raquel, Dra. Léa Cysne, Rosa, Dra. Rosa Pinho, Thereza Benévolo, Wellington, Dra. Alda e Dr. Ernesto Caffarena. Também agradeço a todos os outros integrantes do IOC que de alguma forma participaram na realização desse estudo.

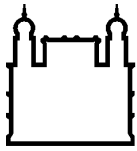
À Dra. Cíntia Borba pela ajuda para o início de meu doutorado.

A todos meus grandes amigos e amigas, cujos nomes infelizmente não tenho espaço para escrever aqui, mas cuja amizade e apoio foram essenciais para mim nesse período de minha vida. Agradeço em especial a todos os amigos da Biologia/UERJ C97 e agregado(a)s, ao pessoal da Informática/PUC 97 e aos ex-colegas (mas sempre amigos) do Colégio São José.

Aos integrantes da minha banda Noisecraft, por todos esses anos de música. Sem essa divertida válvula de escape artística e emocional, a realização desse estudo teria sido muito mais árdua em diversos momentos.

A todos meus familiares, avós, tios e primos e, de forma especial, aos meus irmãos Cecília, Guilherme, Helena e Patrícia, à minha mãe, Elizabeth, e ao meu pai, João Bosco, por terem sempre me apoiado, me animado e me ensinado a ser quem sou hoje. Agradeço também ao Leandro, Igor e Alfredo pela amizade e ao Magalhães, Lúcia e Luciana por todo apoio, amizade e carinho nesses anos.

De todo coração, agradeço à pessoa mais importante de minha vida: minha namorada Alexandra. Por todo seu amor incondicional, ajuda inestimável, amizade sem limites, estímulo nos momentos difíceis e paciência inesgotável, meu muitíssimo obrigado! Te amo!



Ministério da Saúde

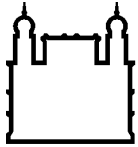
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

***Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Participação de fatores do hospedeiro e do parasito no curso da infecção experimental em camundongos.**

RESUMO

A leishmaniose é uma antropozoonose que afeta 88 países, o que denota a importância da realização de estudos que permitam o desenvolvimento de novas estratégias de vacinação ou quimioterapias. Os agentes etiológicos dessa doença são espécies do gênero *Leishmania*, sendo que, no Brasil, a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* está relacionada à forma tegumentar da leishmaniose e está expandindo sua área de distribuição geográfica. O modelo murino de infecção experimental tem sido largamente empregado nos estudos de leishmanioses, por permitir o controle das características do hospedeiro e a análise de aspectos específicos da doença. O presente estudo tem por objetivo verificar a atuação de fatores de interação parasito-hospedeiro nesse modelo de infecção utilizando linhagens de camundongos com diferentes graus de susceptibilidade. Para tanto, efetuamos o seqüenciamento da extensão COOH-terminal de um tipo específico de cisteína proteinase (CP) do parasito, a CPB, e, em seguida, o mapeamento *in silico* de epitopos de MHC classe I nessa sequência. Os epitopos preditos foram então sintetizados e utilizados em ensaios *in vivo* (vacinação) e *in vitro* (indução de blastogênese e de expressão de citocinas e efeitos sobre os linfócitos T CD4+ e CD8+). Alguns desses epitopos preditos demonstraram efeitos antigênicos nos ensaios *in vitro*, porém sem efeitos perceptíveis nos ensaios *in vivo*. Os epitopos preditos P4 e P5 induziram a blastogênese em culturas de células de camundongos BALB/c (mais susceptíveis a *Leishmania*), enquanto P2, P8 e P9 o fizeram em células de células de camundongos CBA (menos susceptíveis). Os epitopos P5, P6 e P8 também promoveram alterações nas porcentagens dos linfócitos CD4+ ou CD8+ em culturas de células de camundongos BALB/c. Quanto à indução da expressão de citocinas, os epitopos P1 e P2 (em BALB/c) e P2 e P3 (em CBA) induziram à expressão de citocinas relacionadas à resposta imune tipo Th1; P6 (em BALB/c) e P8 (em CBA) à expressão de citocinas da resposta Th2; e P4 (em BALB/c) e P9 (em CBA) à expressão de citocinas dos dois tipos de resposta imune. Ensaios de *Molecular Docking* foram utilizados para auxiliar na compreensão dos fenômenos de interação nos complexos epitopos/MHC, apontando para padrões de interação associados aos padrões de indução da expressão de citocinas. Adicionalmente, foram efetuados ensaios de PCR em tempo real para se analisar os padrões de expressão de genes de moléculas de MHC do hospedeiro e de CPs do parasito ao longo da infecção, que indicaram distinções na expressão de genes de MHC classes I e II entre as linhagens murinas e na expressão de CPs pelo parasito, o que pode estar relacionado às diferentes formas de progressão da infecção nessas linhagens. Os resultados obtidos nesse estudo complementam os dados da literatura sobre as interações parasito-hospedeiro na infecção experimental murina e apontam para novas estratégias de análise dessas interações em leishmanioses.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Leishmania (Leishmania) amazonensis: roles of host and parasite factors in the evolution of murine experimental infection.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an important zoonosis affecting 88 countries and studies focused on the development of new strategies of vaccination and chemotherapies are in large need. The etiological agents of this disease are parasites from the genus *Leishmania* and, in Brazil, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* has been related to cases of tegumentary leishmaniasis and is currently presenting an expansion in its distribution area. Experimental *Leishmania* infection in mice has been widely used for studies of this disease as it allows a high level of control on host characteristics and, also, for permitting the analysis of specific aspects of the infection. Our study aims to assess the roles of some host-parasite interaction factors in this study model, comparing mice strains with distinct susceptibility levels to *Leishmania* infection. For this purpose, we sequenced the COOH-terminal extension of *L. (L.) amazonensis* cysteine-proteinase (CP) B and proceeded an *in silico* MHC class I epitope mapping on this sequence. The predicted epitopes were synthesized and used for an array of assays: *in vivo* (vaccination) and *in vitro* (blastogenesis induction, cytokines expression and CD8+/CD4+ T cells phenotype influence). Some predicted epitopes did present antigenic effects over cell cultures, but none presented effects in the *in vivo* assays. Predicted epitopes P4 and P5 were able to induce blastogenesis in BALB/c cell cultures (a *Leishmania* highly susceptible mouse strain), whereas epitopes P2, P8 and P9 had the same effect on CBA cell cultures (a less susceptible mouse strain). Predicted epitopes P5, P6 and P8 promoted CD8+/CD4+ T cells phenotype variations in BALB/c cell cultures, but no tested epitope had such effect on CBA cell cultures. As for cytokines induction, P1 and P2 (in BALB/c cell culture) and P2 and P3 (in CBA cell culture) were able to promote Th1 response-related cytokines expression; P6 (BALB/c) and P8 (CBA) were able to promote Th2 response-related cytokines expression; and, P4 (BALB/c) and P9 (CBA) were able to induce the expression of cytokines related to both Th responses types. Molecular docking assays were performed to study the interaction patterns occurring in the epitopes/MHC complexes and pointed to patterns related to the cytokines expression profiles observed. Additionally, real time PCR assays were used to analyze host MHC and parasite CPs gene expression patterns along the infection. These assays indicated distinctions in MHC classes I and II genes expression between the tested mice strains, as well as, in CPs genes expression, which may be related to the different patterns of infection progression observed in these strains. Our results represent new information on host-parasite interaction in murine *Leishmania* infection and point towards new strategies for the analysis of such interaction.

SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – graus Celsius
Å - angstrom
aas - aminoácidos
AIDS – *acquired immunodeficiency syndrome*
APP - antígeno particulado de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*
BHI – *brain heart infusion*
BSA – *bovine serum albumin*
BLAST - *basic alignment search tool*
CCL - *CC chemokine ligand*
CCR - *CC chemokine receptor*
CXCL – *CXC chemokine ligand*
CD - *cluster of differentiation antigen*
cDNA - *complementary deoxyribonucleic acid*
céls - células
CP - cisteína-proteinase
Con A – concanavalina A
cpm – contagem por minuto
Ct - *threshold cycle*
Cy5 – *Cy-chrome 5*
DCs – *dendritic cells*
DEPC – dietil pirocarbonato
dNTPs - dextrorribonucleotídeos fosfatados
DTT - ditioneitol
EC - *Enzyme Commission*
ELISA - *enzyme linked immunosorbent assay*
ES-MS – *electron spray mass spectrometry*
g - gravidade
gp63 – glicoproteína de 63 kDa
h - hora
H-2 – MHC de camundongo
HLA – *human leukocyte antigen*
HPLC – *high performance liquid chromatography*
IFN – interferon
IgG – imunoglobulina do tipo G
IL – interleucina
IPTG - isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
kcal - kilocaloria
LACK - *Leishmania homologue of receptors for activated C-kinase*
LB - Luria-Bertnani
μCi - microCurie
min - minuto
MIP – *macrophage inflammatory protein*
μg – micrograma
mg - miligrama
μL – microlitro
mL - mililitro
mm² – milímetro quadrado
mRNA – *messenger ribonucleic acid*

MHC – *major histocompatibility complex*
NF-κB – *nuclear factor kappa B*
ng - nanograma
NK - *natural killer lymphocyte*
nm - nanômetro
NO – *nitric oxide* (óxido nítrico)
P1 - epitopo predito de *L. (L.) amazonensis* 1
P2 - epitopo predito de *L. (L.) amazonensis* 2
P3 - epitopo predito de *L. (L.) amazonensis* 3
P4 - epitopo predito de *L. (L.) amazonensis* 4
P5 - epitopo predito de *L. (L.) amazonensis* 5
P6 - epitopo predito de *L. (L.) amazonensis* 6
P7 - epitopo predito de *L. (L.) amazonensis* 7
P8 - epitopo predito de *L. (L.) amazonensis* 8
P9 - epitopo predito de *L. (L.) amazonensis* 9
pb – par de bases
PBS – *phosphate buffered saline*
PCR – *polymerase chain reaction*
PDB – *Protein Data Bank*
PE - ficoeritrina
POPOP - 1,4-bis(5-feniloxazole-2-il) benzeno
PPO - 2,5-difeniloxazole,
RANTES - *CC chemokine ligand 5*
RMSD - *Root Mean Square Deviation*
RNA – *ribonucleic acid*
rpm – rotações por minuto
RPMI – Roswell Park Memorial Institute
RQ - quantidade relativa ou níveis de expressão normalizados
RT – *reverse transcriptase*
seg - segundo
SFB – soro fetal bovino
STAT - *signal transducers and activators of transcription*
TGF - *transforming growth factor*
Th1 – *T helper cell type 1*
Th2 – *T helper cell type 2*
TNF – *tumor necrosis factor*
UI – unidade internacional
v/v – volume em volume
X-gal - 5-bromo-4-cloro-indolil-β-D-galactopiranosídeo

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	01
1. Leishmaniose	01
1.1. Histórico	01
1.2. Características clínicas	03
1.3. Distribuição geográfica e epidemiologia	05
2. Parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	06
2.1. Classificação taxonômica	06
2.2. Ciclo de vida	08
2.3. <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	09
3. Modelos animais de infecção	10
3.1. Modelos de infecção experimental em animais para estudos em leishmaniose	10
3.2. O modelo de infecção experimental por <i>Leishmania</i> em camundongos	11
3.3. Aspectos gerais da infecção experimental por <i>L. (L.) amazonensis</i> em camundongos	12
3.4. Características da resposta imune inata na infecção experimental por <i>L. (L.) amazonensis</i> em camundongos	15
3.5. Características da resposta imune adaptativa na infecção experimental por <i>L. (L.) amazonensis</i> em camundongos	19
3.6. Efeitos das citocinas e quimiocinas na infecção experimental por <i>L. (L.) amazonensis</i> em camundongos	22
4. Fatores de interação parasito-hospedeiro	25
4.1. Fatores de virulência em <i>Leishmania</i>	25
4.2. Cisteína-proteinases de <i>Leishmania</i>	26
4.3. Cisteína-proteinases como fatores de virulência	28
4.4. Efeitos da CPB no equilíbrio das respostas Th1/Th2	30
4.5. A extensão COOH-terminal da CPB e o sistema imune do hospedeiro	32
JUSTIFICATIVA	34

OBJETIVOS	35
1. Objetivo geral	35
2. Objetivos específicos	35
MATERIAL E MÉTODOS	36
1. Cultivo de parasitos	36
2. Camundongos e infecção experimental	36
3. Sequenciamento da extensão COOH-terminal de CPB de <i>L. (L.) amazonensis</i>	37
4. Estratégia de seleção <i>in silico</i> de epitopos	40
5. Síntese e análise dos epitopos preditos	42
6. Vacinação com os epitopos preditos sintetizados	42
7. Avaliação da blastogênese em culturas de células de linfonodo de camundongos	43
8. Análise fenotípica das culturas de linfócitos de linfonodo de camundongos	44
9. Avaliação da expressão de citocinas e óxido nítrico por células de linfonodo de camundongos	45
10. Análise estatística dos dados	46
11. Ensaios de interação molecular dos complexos H-2/epitopos <i>in silico</i> (<i>Molecular Docking</i>)	46
12. Extração de RNA total	48
13. Síntese de cDNA a partir das amostras de RNA total	49
14. Seleção das sequências de nucleotídeos de interesse	50
15. Desenho e obtenção dos iniciadores para os ensaios de PCR	51
16. Ensaios de PCR convencional	51
17. Ensaios de PCR em tempo real	52
18. Determinação da expressão relativa de genes	53
RESULTADOS	55
1. Definição das sequências de nucleotídeos e aminoácidos da extensão COOH-terminal de CPB de <i>L. (L.) amazonensis</i>	55

2. Comparações das sequências de aminoácidos de extensões COOH-terminal de CPs de diversas espécies de <i>Leishmania</i>	55
3. Definição de epitopos de H-2 classe I hipotéticos presentes nas sequências das extensões COOH-terminal de CPs de <i>Leishmania</i>	57
4. Efeitos da imunização prévia com os epitopos preditos sobre o desenvolvimento das lesões em camundongos submetidos a infecção experimental	61
5. Indução de blastogênese em células de camundongo em cultura pelos epitopos preditos	61
6. Influência dos epitopos preditos sobre os fenótipos CD4+ e CD8+ dos linfócitos de camundongo em cultura	64
7. Produção de citocinas e óxido nítrico por células de camundongo em cultura induzida pelos epitopos preditos	68
8. Análise das energias e tipos de interações dos complexos H-2/epitopos por <i>Molecular Docking</i>	71
9. Seleção dos iniciadores oligonucleotídicos e padronização das condições de termociclagem para ensaios de PCR	76
10. Padronizações para os ensaios de PCR em tempo real	79
11. Expressão relativa dos genes de MHC durante o curso da infecção experimental por <i>L. (L.) amazonensis</i> em camundongos	79
12. Predominância da expressão de genes de CPB de <i>L. (L.) amazonensis</i> sobre os genes de CPC durante a infecção experimental murina	85
DISCUSSÃO	87
CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
ANEXOS	119

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Ilustração representativa do vetor pGEM-T Easy, utilizado nos ensaios de seqüenciamento da extensão COOH-terminal da CPB de *L. (L.) amazonensis*. 38
- Figura 2** – Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos da extensão COOH-terminal de CPB de *L. (L.) amazonensis*. 56
- Figura 3** – Sequências completas das extensões COOH-terminal dos grupos definidos por similaridade para CPs de diferentes espécies de *Leishmania*. 58
- Figura 4** - Acompanhamento do desenvolvimento de lesões em camundongos BALB/c e CBA após infecção experimental com *L. (L.) amazonensis*. 63
- Figura 5** – Blastogênese em culturas de células de linfonodos de camundongos induzida pela ação de epitopos preditos derivados da extensão COOH-terminal de CPB de *L. (L.) amazonensis*. 65
- Figura 6** – Porcentagens de linfócitos T CD8+ ou CD4+ em culturas de células de linfonodo de camundongos BALB/c após incubação com os epitopos preditos derivados da extensão COOH-terminal de CPB de *L. (L.) amazonensis*. 66
- Figura 7** – Porcentagens de linfócitos T CD8+ ou CD4+ em culturas de células de linfonodo de camundongos CBA após incubação com os epitopos preditos derivados da extensão COOH-terminal de CPB de *L. (L.) amazonensis*. 67
- Figura 8** – Energia intermolecular prevista (kcal/mol) para os complexos H-2/epitopos pelos ensaios de *Molecular Docking in silico*. 72
- Figura 9** – Número previsto de pontes de hidrogênio formadas para os complexos H-2/epitopos pelos ensaios de *Molecular Docking in silico*. 73

Figura 10 – Número previsto de contatos de Van der Waals formados para os complexos H-2/epitopos pelos ensaios de <i>Molecular Docking in silico</i> .	74
Figura 11 – Análise dos produtos de amplificação em gel de agarose a 2%.	78
Figura 12 – Níveis de expressão de genes de MHC classe I e classe II de camundongos BALB/c ao longo da infecção experimental com <i>L. (L.) amazonensis</i> .	83
Figura 13 – Níveis de expressão de genes de MHC classe I e classe II de camundongos CBA ao longo da infecção experimental com <i>L. (L.) amazonensis</i> .	84
Figura 14 – Níveis de expressão de genes de CPB e CPC de <i>L. (L.) amazonensis</i> nos sítios da lesão ou de seu linfonodo poplíteo drenante em camundongos das linhagens BALB/c e CBA na 12 ^a semana de infecção.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Níveis de similaridade (em porcentagem) retornado pelo uso da ferramenta de alinhamento <i>ClustalW</i> para os diferentes grupos de extensões COOH-terminal de CPs de <i>Leishmania</i>	59
Tabela II – Epitopos preditos de MHC classe I nas sequências dos grupos CT	60
Tabela III – Epitopos selecionados para síntese química e utilizados nos ensaios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	62
Tabela IV – Níveis de citocinas no sobrenadante de culturas de células de linfondo de camundongos BALB/c, previamente infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> , após incubação com epitopos preditos e controles	69
Tabela V – Níveis de citocinas no sobrenadante de culturas de células de linfondo de camundongos CBA, previamente infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> , após incubação com epitopos preditos e controles	70
Tabela VI – Pares de iniciadores desenhados para a análise da expressão de genes-alvo no parasito e no hospedeiro por ensaios de PCR em tempo real	77
Tabela VII – Resultados da análise de produtos de PCR dos genes-alvo de <i>Leishmania</i> e camundongo pela ferramenta NCBI BLAST	80
Tabela VIII – Análise da especificidade dos pares de iniciadores e da eficiência de amplificação das combinações de pares de iniciadores e amostras de cDNA nos ensaios de PCR em tempo real	81

INTRODUÇÃO

1. Leishmaniose

1.1. Histórico

Os registros históricos de possíveis casos de leishmaniose no Velho Mundo remontam a milhares de anos. Descrições de uma doença, chamada botão do oriente, a qual provocava lesões com características compatíveis com as causadas pela leishmaniose cutânea, estão presentes em tábuas armazenadas na biblioteca do rei Assurbanípal, do Império Assírio, datando do século VII a.C.. Contudo, considera-se que estas podem ser transcrições de textos ainda mais antigos, estes datando de entre 1.500 a 2.500 anos a.C. (Cox, 2002).

O documento conhecido como papiro de Ebers, que data de aproximadamente 2.000 anos a.C. e é um dos tratados médicos mais antigos que se tem conhecimento, também relata uma doença com características que tornam possível a sua identificação como leishmaniose cutânea, chamada botão do Nilo (Oumeish, 1999).

No século X, o médico árabe Avicena descreveu detalhadamente uma doença batizada de úlcera de Balkh (uma cidade ao norte do Afeganistão), sendo esta a mesma doença denominada botão do oriente, presente nos textos assírios. Essa mesma doença causadora de lesões (úlceras) também foi descrita posteriormente em outras regiões do Oriente Médio, como Bagdá e Jericó (Cox, 2002).

Existem propostas de que uma das pragas do Egito, descrita como pústulas conforme a narrativa do livro do Êxodo da Bíblia Cristã, poderia ter sido baseada em uma epidemia de leishmaniose cutânea (Oumeish, 1999).

O mérito da descrição inicial dos parasitos causadores dessas doenças, ou seja, da leishmaniose cutânea do Velho Mundo, é atribuído ao patologista americano James Homer Wright, em 1903, ele descreveu os parasitos isolados de uma criança com suspeita de botão do oriente e os classificou como *Helcosoma tropicum* (Wright, 1903). Posteriormente, em 1906, esta espécie foi reclassificada como *Leishmania tropica* por Luhe (apud Altamirano-Enciso et al., 2003). Contudo, existem indícios de que estes parasitos já haviam sido observados anteriormente, em 1885, por David Cunningham e, em 1898, por Piotr Borovsky (apud Cox, 2002).

Já a descrição dos agentes etiológicos da leishmaniose visceral do Velho Mundo (ou calazar) é atribuída de forma independente ao médico do exército escocês William Leishman e ao professor de fisiologia da universidade de Madras Charles Donovan, em 1903. O primeiro fez a descrição do parasito ao analisar amostras de fígado de um soldado inglês morto pela febre Dum-Dum na Índia, enquanto o segundo analisou aspirados esplênicos de um menino hindu com febre irregular (Leishman, 1903; Donovan, 1903). Nesse mesmo ano, Laveran e Mensil classificaram esse organismo como *Piroplasma donovani* (Laveran & Mesnil, 1903) e Ronald Ross propôs a reclassificação para *Leishmania donovani*, criando o gênero *Leishmania* (Ross, 1903).

Por fim, o processo de identificação do vetor dessas enfermidades mostrou-se moroso e somente em 1921 conseguiram-se provas experimentais da transmissão dos parasitos por insetos dípteros pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, conforme descrito pelos irmãos Edouard e Etienne Sergent et al., após ensaios de infecção de hamsters com macerados de insetos (Sergeant et al., 1921). Ainda assim, o modelo de infecção durante o repasto sanguíneo dos insetos somente foi demonstrado por Adler e Ber em 1941 (Adler e Ber, 1941).

A ocorrência de casos de leishmaniose cutânea e mucocutânea no Novo Mundo (Américas) também está registrada desde a antiguidade: esculturas de cerâmica de civilizações pré-colombianas anteriores aos Incas no Equador e Peru, datadas do século I, mostram lesões na pele e deformidades faciais similares a casos de leishmaniose (Léon & Léon, 1976; Oumeish, 1999). Manuscritos de missionários espanhóis do século XVI também relatam possíveis casos da doença (Léon & Léon, 1976; Cox, 2002).

A civilização Inca apresentava um comportamento curioso com relação aos casos de leishmaniose cutânea e os de mucocutânea: a marca da lesão cutânea (denominada *uta*) era considerada uma marca benigna e seus portadores podiam se converter em xamãs ou curandeiros, enquanto os casos de leishmaniose mucocutânea (ou *espundia*) eram considerados malignos e destrutivos (Léon & Léon, 1976; Altamirano-Enciso et al., 2003).

Em 1895, houve a primeira descrição de um caso de leishmaniose cutânea no Brasil, por Juliano Moreira, identificando casos na Bahia como similares àqueles descritos em países do Velho Mundo e batizando a doença de botão da Bahia (Moreira, 1895).

Já Alfonso Splendore, em 1911, diagnosticou a ocorrência do primeiro caso de leishmanose muco-cutânea em território brasileiro (Splendore, 1911) e Gaspar Vianna, nesse mesmo ano, ao estudar casos de leishmaniose no país, atribuiu-os a uma nova espécie de *Leishmania*, a qual ele batizou originalmente de *Leishmania brasiliensis*, sendo foi posteriormente renomeada como *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Vianna, 1911).

Quanto ao histórico da leishmaniose visceral no Brasil, a descrição do primeiro caso autóctone foi realizada por Luis Migone, em 1913 no Paraguai, em um paciente oriundo do Estado do Mato Grosso (Migone, 1913).

Existe controvérsia sobre a existência de leishmaniose visceral no Novo Mundo antes da colonização Européia. Apesar de especular-se que a espécie causadora dessa manifestação clínica, a *Leishmania (Leishmania) chagasi*, teria sido introduzida pela migração dos colonos, existem evidências de que, na verdade, essa espécie teria sido trazida para a região a milhões de anos atrás, pela migração de canídeos (Lainson & Shawn, 1987).

O vetor envolvido na transmissão da leishmaniose no Novo Mundo foi originalmente descrito por Henrique Aragão em 1922, a partir do estudo de um surto de leishmaniose cutânea no Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Aragão, 1922). À época o inseto vetor flebotomíneo, vulgarmente chamado de mosquito-palha, foi classificado como *Phlebotomus intermedius*, mas posteriormente seu gênero foi corrigido para *Lutzomyia* (Lainson, 1996).

1.2. Características clínicas

O termo leishmaniose é comumente empregado para se referir ao conjunto de manifestações clínicas que advêm da infecção por parasitos do gênero *Leishmania* em um hospedeiro mamífero. Essa infecção apresenta-se bastante diversa e complexa, variando de casos benignos de lesões cutâneas com cura espontânea a casos fatais de infecção visceralizada (Herwaldt, 1999).

As leishmanioses podem ser organizadas em quatro grupos, tendo por base as características de localização das manifestações clínicas durante a infecção: leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral. Entretanto, essa é uma organização generalista e as características da patologia em cada um desses grupos podem variar de acordo com a espécie de *Leishmania* responsável pela infecção (Reithinger et al., 2007). Outra forma de organização reúne os três primeiros grupos num único

grupo: leishmaniose tegumentar, enquanto mantém a leishmaniose visceral como um grupo distinto (Marzochi & Marzochi, 1994).

A leishmaniose cutânea localizada apresenta como característica o surgimento de uma ou múltiplas lesões ulceradas, podendo, em alguns poucos casos, também causar outros tipos de manifestações cutâneas como lesões vegetativas verrucosas, pápulas, nódulos e infiltrações na pele. Esse tipo de leishmaniose pode ser causado por diversas espécies dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, sendo que as características das lesões podem variar de acordo com a espécie de *Leishmania* causadora da infecção. Por exemplo, as lesões apresentam ampla infiltração por macrófagos vacuolados sob o tecido cutâneo nas bordas, quando causadas por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, ou apresentam infiltração mais modesta com poucos macrófagos, mas com forte presença de linfócitos, quando causadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Silveira et al., 2004).

A leishmaniose cutânea difusa é uma forma relativamente rara de manifestação clínica, estando associada a espécies do subgênero *Leishmania*. As características desse tipo de leishmaniose são: presença de um infiltrado difuso sob o tecido cutâneo e surgimento de um grande número de nódulos e pápulas, que raramente apresentam ulceração. Em casos avançados, as lesões disseminadas podem cobrir uma extensa área corporal, mas, em geral, estas estão presentes predominantemente nas extremidades (Silveira et al., 2004).

Na leishmaniose mucocutânea, observa-se a necrose do tecido da mucosa nasofaríngea, que pode progredir para a necrose das estruturas cartilaginosas associadas. Há também a presença de um abundante infiltrado de linfócitos (Silveira et al., 2004). Obstruções e sangramentos na região oronasal podem ser observados e, com a progressão das lesões, pode ocorrer desfiguramento facial. Essa manifestação clínica ocorre em sucessão a uma manifestação cutânea prévia, sendo a principal espécie associada a esse tipo de leishmaniose a *L. (L.) braziliensis* (Herwaldt et al., 1992).

A leishmaniose visceral ou calazar é caracterizada pelas seguintes manifestações clínicas: hepato-esplenomegalia rígida, febre acompanhada de taquicardia e caxequia, além de hipoalbuminemia e a hiperglobulinemia policlonal. Em alguns casos, também pode ser observada hiperpigmentação da pele (originando o nome calazar, que pode ser traduzido do Hindu como febre negra). Até 10% dos casos de leishmaniose visceral, quando causados pela espécie *Leishmania (Leishmania) donovani*, podem evoluir, mesmo após aparente cura da

infecção inicial, para uma manifestação cutânea denominada leishmaniose dérmica pós-calazar. Essa manifestação caracteriza-se pelo surgimento de nódulos na face ou na superfície extensora dos membros que podem perdurar por anos (Carvalho et al., 1992).

1.3. Distribuição geográfica e epidemiologia

A leishmaniose afeta uma ampla região ao redor do globo terrestre, 88 países são afetados por essa parasitose, dos quais 72 são países em desenvolvimento (OMS, 2009). Devido à sua capacidade de circular entre humanos e animais comumente encontrados em áreas domiciliares ou peridomiciliares, a leishmaniose é classificada como uma importante antropozoonose. Mamíferos como roedores, felinos, caninos, equinos, macacos e preguiças podem servir de reservatórios para parasitos do gênero *Leishmania* (Gramicci & Gradoni, 2005).

Estimativas pela Organização Mundial de Saúde indicam que existem cerca de 350 milhões de pessoas sob risco em regiões de ocorrência de leishmaniose (OMS, 2009). Como a notificação de casos é compulsória em apenas 32 dos países afetados, não existem números precisos de prevalência e incidência dessa infecção. Entretanto, a prevalência é estimada em 12 milhões de casos, enquanto a incidência anual seria 500 mil de novos casos de leishmaniose visceral e entre 1 e 1,5 milhões de novos casos de leishmaniose tegumentar.

Os diferentes tipos de leishmaniose apresentam distribuições com características endêmicas em países específicos (OMS, 2002):

- 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão;
- 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru;
- 90% dos casos de leishmaniose cutânea (incluindo localizada e difusa) ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita, Síria e Argélia.

Desde o início da década de 1990, tem-se observado uma expansão na distribuição geográfica dos casos de leishmaniose ligada a um aumento no número de casos (Marzochi & Marzochi, 1994; Reithinger et al., 2007). No entanto, apesar dos altos índices mundiais de incidência e prevalência e da tendência de expansão do território afetado, a leishmaniose ainda é alvo de relativo pouco esforço de

pesquisa e de medidas profiláticas, estando, por isso, classificada no grupo das doenças tropicais negligenciadas (OMS, 2009).

Especificamente no Brasil, a leishmaniose pode ser classificada como uma doença sem controle efetivo (Oliveira et al., 2004). Existe uma expansão da área afetada por casos de leishmaniose visceral, com uma tendência de urbanização da doença. Apesar da região nordeste do país ainda concentrar a maior parte dos casos dessa infecção, as demais regiões têm gradualmente aumentado sua participação no número de casos (de 15% em 1998 a 44% em 2005) e quase um terço dos municípios do país já tem registro de casos de leishmaniose visceral.

Os fatores responsáveis por essa expansão seriam: mudanças climáticas, migração de populações, interações de reservatórios silvestres com cães infectados em áreas sem transmissão prévia e adaptação dos insetos-vetores a áreas peridomiciliares (Maia-Elkhoury et al., 2008). Os casos de leishmaniose tegumentar também vêm apresentando uma tendência de expansão territorial nas últimas décadas, além de aumento na prevalência, sendo que aproximadamente 35% dos municípios do país já têm o registro de casos autóctones (Ministério da Saúde, 2007).

2. Parasitos do gênero *Leishmania*

2.1. Classificação taxonômica

A seguinte estrutura de classificação taxonômica é utilizada atualmente para a classificação dos parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* (apud Brands, 2010):

- **Domínio** *Eukaryota*
- **Reino** *Protozoa* (Goldfuss, 1818) R. Owen, 1858
- **Infra Reino** *Excavata* (Cavalier-Smith, 2002)
- **Filo** *Euglenozoa* (Cavalier-Smith, 1981)
- **Subfilo** *Saccostoma* (Cavalier-Smith, 1998)
- **Classe** *Kinetoplastea* (Honigberg, 1963) L. Margulis, 1974
- **Ordem** *Trypanosomatida* (Kent, 1880) Hollande, 1952
- **Família** *Trypanosomatidae* (Doflein, 1901)
- **Gênero** *Leishmania* (Ross, 1903)

Estes parasitos estão classificados na classe *Kinetoplastea* devido à presença de uma estrutura denominada cinetoplasto, caracterizada por uma grande

quantidade de cadeias de ácido dextrorribonucléico (DNA – *deoxyribonucleic acid*) em formato de disco, com várias cópias de genoma mitocondrial, localizada no interior de uma mitocôndria associada à base do flagelo do organismo (Riou & Delain, 1969).

A ordem em que este gênero está localizado (*Trypanosomatida*) é constituída por organismos parasitos com a presença de apenas um flagelo, podendo infectar apenas um (em geral, insetos) ou mais (mamíferos ou vegetais) hospedeiros em seu ciclo de vida (Podlipaev, 2001; Simpson et al., 2006). Além do gênero *Leishmania*, outro gênero que apresenta parasitos de importância médica nessa ordem é o gênero *Trypanosoma*, com espécies como o *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas (Chagas, 1909), e o *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono africana (Bruce, 1895 *apud* Simpson et al., 2002).

Apesar dos primeiros registros humanos de casos de leishmaniose, há milhares de anos atrás, estarem presentes no Velho Mundo, existe a proposta de que, na verdade, os parasitos do gênero *Leishmania* teriam tido origem em regiões Neotropicais (Noyes, 1998; Noyes et al., 2000).

O gênero *Leishmania* é dividido em três subgêneros: *Leishmania*, *Viannia* e *Sauroleishmania*. Existe a proposta de que esses subgêneros divergiram em diferentes momentos entre o início e a segunda metade do Mioceno, com o subgênero *Viannia* ramificando-se primeiro, conforme sugerido por análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do gene da subunidade menor do ribossomo (Noyes, 1998). Esses subgêneros apresentam distribuições geográficas distintas: o subgênero *Viannia* está presente apenas nas Américas, o subgênero *Sauroleishmania* é encontrado apenas no Velho Mundo e o subgênero *Leishmania* pode ser encontrado em ambas as regiões (Noyes, 1998; Bates, 2007). Também se observa diferenças quanto aos vetores e hospedeiros (ou reservatórios) para cada um desses gêneros (Bates, 2007):

- O subgênero *Viannia* apresenta como vetores os insetos flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* e parasita hospedeiros mamíferos;
- O subgênero *Leishmania* apresenta como vetores os insetos flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* (no Velho Mundo) e *Lutzomyia* (no Novo Mundo) e parasita hospedeiros mamíferos;
- O subgênero *Sauroleishmania* apresenta como prováveis vetores os insetos flebotomíneos do gênero *Sergentomyia* e parasita hospedeiros répteis.

Por sua característica de parasitar somente répteis, os parasitos do subgênero *Sauroleishmania* não apresentam importância direta para a saúde humana e, portanto, não serão considerados nas demais descrições e análises desse trabalho.

A diferença inicial utilizada como base para propor a separação entre os subgêneros *Viannia* e *Leishmania* referia-se à região onde os promastigotas metacíclicos migram e se aderem durante seu desenvolvimento no inseto vetor: promastigotas *Viannia* seguem para a região pilórica do intestino posterior, enquanto promastigotas *Leishmania* seguem para a válvula estomodeal, localizada na interseção entre os intestinos médio e anterior do inseto. Apesar da distinção entre esses dois subgêneros ter sido baseada de início principalmente nessa característica, análises filogenéticas baseadas em sequências de DNA comprovaram essa separação (Bates, 2007).

Além da organização por subgêneros, o gênero *Leishmania* também é usualmente dividido em complexos, englobando espécies com características relacionadas. As espécies do subgênero *Leishmania* podem ser divididas em cinco complexos: complexo da *Leishmania (Leishmania) hertigi*, complexo da *Leishmania (Leishmania) tropica*, *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) major* e *Leishmania (Leishmania) mexicana* (Noyes, 1998). As espécies do subgênero *Viannia* são por vezes classificadas sob um único complexo: complexo da *Leishmania (Leishmania) braziliensis*.

2.2. Ciclo de vida

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam um ciclo de vida do tipo heteroxêncio (digenético), habitando o intestino médio de insetos flebotomíneos em uma parte de seu ciclo de vida e parasitando células de hospedeiros mamíferos em outra.

Os insetos vetores dos gêneros *Phlebotomus* (no Velho Mundo) e *Lutzomyia* (no Novo Mundo) adquirem os parasitos durante o repasto sanguíneo em mamíferos infectados. Os parasitos estão presentes no sangue ingerido, no interior de células do sistema mononuclear fagocitário, como amastigotas. Nessa etapa evolutiva, os parasitos apresentam-se como células arredondadas, sem flagelo visível e com diâmetro entre 3 e 7 μm (Killick-Kendrick, 1990).

Os amastigotas então se transformam em promastigotas dentro da matriz peritrófica, durante o processo de digestão do inseto. Essa etapa evolutiva é caracterizada por células com um perfil alongado, móveis, com flagelo visível em sua

porção anterior e com comprimento entre 10 e 20 μm . Os parasitos passam então a habitar o trato intestinal do flebotomíneo, onde se multiplicam pelo processo de fissão binária (Guevara et al., 2001).

Os promastigotas podem ser classificados em dois tipos: os procítilos e os metacítilos. Após atingir a forma metacíclica, caracterizada pela presença de lipofosfoglicanas com cadeias mais longas e com mais ramificações e uma maior resistência à ação de componentes do sistema complemento de mamíferos, os parasitos migram para a probóscide do inseto, onde permanecem até que esse realize um repasto sanguíneo.

Ao se alimentar, o inseto vetor transfere os promastigotas metacíclicos para a pele do hospedeiro mamífero juntamente com sua saliva (Sacks & Kamhawi, 2001). Esses parasitos são então fagocitados pelas células do sistema mononuclear fagocitário, como macrófagos, onde revertem para a forma evolutiva de amastigota (Pulvertaft & Hoyle, 1960).

Os amastigotas sobrevivem e se multiplicam no interior dessas células, até que as levam ao rompimento, pelo número excessivo de parasitos em seu interior. Os parasitos liberados acabam por ser endocitados por outras células, levando assim a uma expansão do processo infeccioso. Eventualmente, outro inseto flebotomíneo pode realizar o repasto sanguíneo nesse hospedeiro, reiniciando o ciclo (revisado por Handman, 1999).

2.3. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

O presente estudo está focado numa cepa de *L. (L.) amazonensis*, uma espécie pertencente ao complexo *L. (L.) mexicana*, que foi descrita pela primeira vez em 1972 por Ralph Lainson e Jeffrey Shawn (Lainson & Shawn, 1972).

Essa espécie tem sido descrita como um importante agente etiológico da leishmaniose tegumentar em humanos, talvez o mais importante dentro de seu complexo, apresentando uma ampla gama de manifestações clínicas em suas infecções (Barral et al. 1991).

Sua distribuição geográfica no Brasil foi definida abarcando a bacia amazônica, além de alguns Estados na Região Sudeste (Minas Gerais), Nordeste (Bahia) e Centro-Oeste (Goiás) (Lainson, 1997), no entanto, recentemente, foram encontradas evidências que indicam que esta espécie está em fase de expansão de sua distribuição geográfica e que está ligada a manifestações clínicas não-usuais em novas áreas de transmissão, especificamente no Estado do Rio de Janeiro, onde

apenas a *L. (V.) braziliensis* era considerada como o agente causativo de leishmaniose cutânea (Azeredo-Coutinho et al., 2007).

A principal espécie de inseto flebotomíneo envolvida como vetor no ciclo de transmissão dessa espécie de *Leishmania* é a *Lutzomyia flaviscutellata*, mas a *Lutzomyia olmeca nociva* também pode agir como vetor em regiões amazônicas. Os principais hospedeiros silvestres deste parasito são roedores (*Proechimys sp.*, *Orzomys sp.*, *Neacomys sp.*, *Nectomys sp.* e *Dasyprocta sp.*), marsupiais (*Metachirus sp.*, *Philander sp.*, *Didelphis sp.* e *Marmosa sp.*) e raposas (*Cerdocyon thous*) (revisto por Basano & Camargo, 2004).

3. Modelos animais de infecção

3.1. Modelos de infecção experimental em animais para estudos em leishmaniose

O uso de modelos de infecção experimental em animais de laboratório faz-se necessário para uma compreensão de aspectos imunológicos da infecção por *Leishmania* (assim como de outros parasitos) e para a caracterização de novas drogas ou protocolos de quimioterapia, uma vez que análise *in vitro* com culturas de células ou *ex vivo* com amostras de tecido podem levar a resultados incorretos ou artificiais.

Os principais pré-requisitos para a escolha de qualquer modelo animal são: apresentar uma fisiologia razoavelmente compatível com a humana, flexibilidade para permitir a análise de diversos aspectos das infecções e uma manutenção de relativa simplicidade, ainda que por vezes as vantagens particulares de um determinado modelo possam suplantar sua deficiência em alguns desses pré-requisitos.

Dessa forma, alguns modelos animais específicos têm sido utilizados para estudos em leishmaniose, sendo estes: camundongos (modelo murino), hamsters, cães e primatas, ainda que nenhum destes seja capaz de reproduzir com precisão as características da leishmaniose humana (de Oliveira et al., 2004; Garg & Dube, 2006; Tavares et al., 2009).

Os hamsters representam um bom modelo animal para estudos iniciais de vacinação, sendo o melhor modelo para o estudo da leishmaniose visceral (de Oliveira et al., 2004). O modelo de estudo em primatas não-humanos é utilizado em etapas mais avançadas de ensaios de vacinação pré-clínica para leishmaniose

visceral, sendo que somente espécies de macacos do Novo Mundo mostram-se susceptíveis à infecção, à exceção de macacos Langur do Velho Mundo. Esse modelo, apesar da difícil manutenção dos animais, é vantajoso devido à relação filogenética muito próxima a seres humanos (Tavares et al., 2009). O uso de cães em ensaios secundários de vacinação contra leishmaniose visceral também tem sido reportado, pois os sintomas apresentados pelos animais infectados são similares aos sintomas humanos (Garg & Dube, 2006, Tavares et al., 2009).

As características da infecção por *Leishmania* podem variar muito entre indivíduos humanos, enquanto em modelos animais, em especial no modelo murino, existe a possibilidade de obter-se um grupo com um perfil de infecção uniforme, como por exemplo, pelo uso de linhagens consanguíneas de camundongos. Essa uniformidade apresenta a vantagem de facilitar a análise de aspectos específicos da infecção, no entanto, inspira cautela na análise dos dados, visto que estes não apresentarão as variações normais observadas em infecções em uma população heterogênea, estando imbuídos de certa artificialidade.

3.2. O modelo de infecção experimental por *Leishmania* em camundongos

O modelo de infecção experimental murino tem sido amplamente utilizado em estudos em leishmaniose para uma melhor compreensão do ciclo de vida do parasito, dos processos de infecção e das interações parasito-hospedeiro. Ainda que, de forma geral, o processo de infecção utilizado nesse modelo seja completamente artificial (com os parasitos sendo inoculados pelo uso de uma seringa ao invés de durante o repasto sanguíneo de flebotomíneos infectados), ele apresenta-se muito flexível e permite um alto nível de controle das características do hospedeiro a ser infectado.

Já existem diversas linhagens consanguíneas ou geneticamente modificadas de camundongos, o que permite a seleção das características de interesse do hospedeiro de acordo com as necessidades específicas do desenho experimental aplicado. As diferenças e similaridades genéticas existentes entre essas linhagens contribuem na definição da evolução da infecção em cada uma delas, sendo este processo de extrema complexidade e multifatorial e, portanto, dificilmente uma única característica pode ser usada com explicação para determinar o resultado da infecção (Sakthianandeswaren et al., 2009).

Por exemplo, já foi sugerido que genes do complexo H-2, ou seja, que codificam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC – *main*

histocompatibility complex) em camundongos, poderiam estar relacionados à multiplicação de parasitos em lesões cutâneas. Dessa forma, seria esperado que camundongos de linhagens que partilhassem um mesmo haplotipo para esses genes apresentassem similaridades nesse aspecto específico da infecção. Entretanto, na verdade, não se observa relação direta entre o haplotipo das linhagens e a multiplicação de parasitos nas lesões e, portanto, outros genes fora do complexo H-2 devem desempenhar papéis ainda mais importantes sobre esse aspecto da infecção (Terabe et al., 2004). Tal observação denota a importância da interação de múltiplos componentes do próprio hospedeiro na progressão da infecção.

3.3. Aspectos gerais da infecção experimental por *L. (L.) amazonensis* em camundongos

O curso de progressão de lesões cutâneas causadas pela infecção por *L. (L.) amazonensis* difere marcadamente entre as várias linhagens consanguíneas de camundongos. Dessa forma, sabe-se que camundongos da linhagem BALB/c são altamente susceptíveis ao desenvolvimento de lesões crônicas causadas por essa espécie de *Leishmania* (Calabrese & Da Costa, 1992). De forma similar, camundongos da linhagem C57BL/10 desenvolvem lesões crônicas com cargas parasitárias persistentes (Afonso & Scott, 1993). Em contraste, camundongos das linhagens C3H, C57BL/6, DBA e CBA são menos susceptíveis à infecção por parasitos do complexo *L. (L.) mexicana*, mas com níveis distintos de resistência, e apresentam um desenvolvimento lento das lesões, ainda que com carga parasitária persistente (Barral et al., 1983; Neal & Hale, 1983; Afonso & Scott, 1993; Soong et al., 1997; Jones et al., 2002).

Além da relevância das características genéticas dos camundongos no curso da infecção por *L. (L.) amazonensis*, existem fatores adicionais de grande influência na progressão da infecção, tais como tamanho do inóculo inicial de parasitos, sítio do inóculo, a cepa de *Leishmania* usada e a fonte original da cepa (por exemplo, isolados de parasitos de casos humanos com manifestações clínicas distintas).

Quanto à importância do inóculo inicial, existe um modelo proposto para simular o parasitismo por um longo período de duração, onde promastigotas metacíclicos foram inoculados na derme da orelha de camundongos BALB/c. Os resultados demonstraram que o estabelecimento das lesões cutâneas foi diretamente dependente do inóculo inicial utilizado. Dessa forma, enquanto em animais

infectados com apenas 10 parasitos as lesões foram raras, a maioria dos animais infectados com 100 parasitos apresentou lesões e todos os animais infectados com 1.000 parasitos desenvolveram lesões progressivas (Courret et al., 2003).

Também já foi reportada a existência de correlação entre o inóculo inicial utilizado e a progressão das lesões em camundongos, no entanto, não se pode observar correlação entre a carga parasitária de uma lesão e seu volume. Tais resultados foram obtidos em ensaios utilizando inóculos de 10^4 amastigotas de um isolado de um caso de leishmaniose cutânea difusa por *L. (L.) amazonensis* em camundongos BALB/c, C57BL/6 e C57BL/10 (Cupolilo et al., 2003).

Já quanto às particularidades que podem advir do uso de isolados de parasitos de casos de infecção humana com sintomas clínicos distintos, foi observado que isolados de *L. (L.) amazonensis* provenientes de casos de leishmaniose cutânea ou mucocutânea foram capazes de promover lesões ulceradas em patas de camundongos BALB/c, com a presença de macrófagos com parasitos em seu citoplasma. Além disso, as infecções causadas por esses isolados apresentaram metástases cutâneas, rápida disseminação de parasitos para o baço dos animais e altos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes. Por outro lado, camundongos dessa mesma linhagem inoculados com isolados de casos humanos de leishmaniose visceral apresentaram lesões nas patas com características completamente diferentes: estas foram discretas e com a presença de infiltrado mononuclear, haviam poucos macrófagos infectados no sítio das lesões e observou-se a formação de granulomas. Ainda, notou-se a ausência de metástases cutâneas, a disseminação dos parasitos para o baço ocorreu tardiamente durante a infecção e observou-se baixos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes (Almeida et al., 1996).

Adicionalmente, já foram propostos modelos murinos para se estudar tipos de evolução específica das leishmanioses como: ulceração de lesões, a metástase de lesões e, mesmo, a osteomielite promovida pelos parasitos.

Para se estudar a ulceração de lesões, foi desenvolvido um modelo de estudo utilizando-se camundongos com imunodeficiência combinada severa. Esse modelo foi baseado em observações de que em alguns casos de leishmaniose em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS – *acquired immunodeficiency syndrome*) a ulceração das lesões não ocorre. De fato, a infecção desses animais com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* levou ao surgimento de lesões cutâneas que não ulceravam, o que foi consistente com as observações anteriores em

pacientes com leishmaniose/AIDS e evidencia um importante papel de linfócitos (tanto T quando B) na formação de úlceras nas lesões (Terabe et al., 1999).

Um sistema desenvolvido para o estudo de metástase de lesões em camundongos infectados por *Leishmania* propôs o uso de pequenos cortes na região lombar de camundongos Balb/c, após a inoculação de parasitos *L. (L.) amazonensis*, para estimular o surgimento das metástases. As análises de carga parasitária em amostras de tecido de camundongos com cortes ou controles, por diluição limitante das células, indicou que, além dos cortes serem efetivos para estimular um desenvolvimento precoce das metástases, a presença de parasitos em áreas equivalentes podia ser detectada antes em camundongos com cortes do que nos controles. Esse resultado sugere uma atuação dos linfócitos T que migraram para as regiões do cortes no surgimento das metástases (Bertho et al., 1994).

O modelo de estudo para a análise de osteomielite provocada por *L. (L.) amazonensis* foi proposta para ajudar na compreensão de como a leishmaniose cutânea difusa por vezes pode afetar o tecido ósseo. Nesse modelo, foi observado o surgimento de infiltrado inflamatório na medula óssea após 90-120 dias da infecção de camundongos Balb/c por inóculo subdérmico de parasitos (isolados de casos humanos de leishmaniose cutânea difusa) no coxim plantar. Nesses animais os macrófagos intra e extra-medulares apresentaram alta carga parasitária, além de ter sido observada a necrose óssea com comprometimento das cartilagens. Dessa forma, foi possível relacionar os processos inflamatórios ocorridos durante a infecção com a destruição óssea e comprometimento das articulações (Costa et al., 2006).

Outro aspecto já analisado é a diferença existente na heterogeneidade das populações de parasitos utilizadas em ensaios de infecção experimental e aquelas que ocorrem nas infecções naturais. A heterogeneidade populacional pode ser crucial nas primeiras etapas da infecção, uma vez que os promastigotas procíclicos são susceptíveis à ação de fatores do sistema complemento (Franke et al., 1985) e durante sua lise estes poderiam liberar antígenos que desempenhassem algum papel na evolução da infecção

Nesse contexto, existe a descrição de ensaios de infecção comparativos, utilizando promastigotas de fase estacionária de crescimento (população heterogênea) com promastigotas metacíclicos purificados em camundongos BALB/c ou C57BL/6. Essas análises mostraram que os padrões de progressão das lesões, produção de citocinas e susceptibilidade das linhagens murinas foram similares em

ambas as condições, à exceção da ocorrência de uma fase inicial sem sintomas evidentes de duração mais longa observada nas infecções com promastigotas metacíclicas (Felizardo et al., 2007).

Também existem relatos de que subgrupos dentro de populações de parasitos *Leishmania* durante o curso de infecções podem simular um processo de apoptose, expondo glicofosfolídeos do tipo fosfatidilserina em sua superfície e, dessa forma, induzindo sua fagocitose por macrófagos pelos receptores de fosfatidilserina destes. Assim, o parasito tem sua entrada na célula facilitada e ainda inibe a produção de NO ao estimular a expressão de citocinas como fator de transformação do crescimento-beta (TGF- β – *transforming growth factor beta*) e interleucina (IL)-10 (De Freitas Balanço et al., 2001).

3.4. Características da resposta imune inata na infecção experimental por *L. (L.) amazonensis* em camundongos

Os papéis desempenhados por células do sistema imune inato, como granulócitos polimorfonucleares, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas (DCs – *dendritic cells*), linfócitos NK (*natural killer*) e fagócito mononucleares, assim como o de componentes não-celulares, como sistema complemento ou receptores *Toll-like* (TLR), já foram descritos em diversos estudos.

Um destes estudos, focado no papel de granulócitos durante a infecção, indicou que este tipo celular é fortemente ativado nas fases iniciais da infecção, pois 10% das células encontradas nos infiltrados inflamatórios em camundongos Balb/c ou C57BL/6 infectados eram granulócitos. Entretanto, apesar de seu forte fluxo migratório para os sítios de lesão, não se observou um efeito notável desse tipo celular no resultado final da infecção nessas linhagens murinas (Pompeu et al., 1991).

Pelo contrário, existe a proposta desse tipo celular agir como um ‘cavalo de tróia’ na infecção murina por *L. (L.) major*, uma vez que essas células entram em estado apoptótico após a fagocitose dos parasitos, ajudando estes na invasão a macrófagos e induzindo a expressão de moléculas anti-inflamatórias por essas células (van Zandbergen et al., 2004; Laskay et al., 2008).

A influência dos eosinófilos na proteção suplementar contra a infecção por parasitos *L. (L.) amazonensis* foi observada em ensaios com camundongos de uma linhagem transgênica deficiente em IL-5 (C3H/HeN-TgN[IL-5]-Imeg). Nessa linhagem que apresenta uma expressiva quantidade de eosinófilos (cerca de 50%) entre seus

leucócitos de sangue periferal, claramente notou-se a capacidade de controle da infecção. Essa resistência também pode ser induzida em camundongos da linhagem BALB/c (normalmente, altamente susceptíveis à infecção por parasitos *L. (L.) amazonensis*) pela transferência de plasmídeos que acarretavam altos níveis de expressão de IL-4, IL-5 e interferon-gama (IFN- γ), que estimulam a atividade dos eosinófilos (Watanabe et al., 2004).

Um fator que parece estar associado à capacidade da *L. (L.) amazonensis* de infectar linhagens de camundongos geralmente resistentes a outras espécies de *Leishmania* é sua elevada capacidade de invadir e se multiplicar em macrófagos. Estudos indicam que a carga parasitária em camundongos CBA/J infectados com *L. (L.) amazonensis* após 12h de inoculação dos parasitos é quase o dobro daquela observada em camundongos infectados por *L. (L.) major* nas mesmas condições. Além disso, os parasitos *L. (L.) amazonensis* mostram maior capacidade de sobreviver no interior de macrófagos ativados por IFN- γ (Gomes et al., 2003).

Em adição, as características da colonização de macrófago por *L. (L.) amazonensis* apresenta divergências em relação ao observado para outras espécies de *Leishmania*: enquanto amastigotas de *L. (L.) major* permanecem em vacúolos individuais diminutos, as de *L. (L.) amazonensis* coabitam em um amplo vacúolo comunal (Castro et al., 2006).

A *L. (L.) amazonensis* também demonstrou um alto grau de resistência à ação de espécies reativas de oxigênio produzidas pelos macrófagos ativados. Já foi descrito que para uma eficiente eliminação de amastigotas dessa espécie pelos macrófagos há a necessidade da produção de superóxido em adição à produção de óxido nítrico (NO – *nitric oxide*) (Mukbel et al., 2007). Além da resistência à ação do NO, esse parasito parece ser capaz de inibir a produção dessa molécula pelos macrófagos: ensaios *in vitro* com uma linhagem de macrófagos murinos mostraram que, quando infectados, estes apresentavam uma redução na produção de NO concomitantemente com uma diminuição na atividade da enzima óxido nítrico sintase induzida. Esse efeito ocorreu independente da ação de citocinas com propriedades de inibir a atividade dessa enzima: IL-4, IL-10 e fator de necrose tumoral-beta (TNF- β – *tumor necrosis factor beta*), mas pôde ser revertida pela ação de INF- γ (Balestieri et al., 2002).

Entretanto, esses resultados não foram consistentes com os dados obtidos em ensaios *in vivo* onde os níveis de NO após estimulação com lipopolissacarídeos em

animais controle ou infectados com *L. (L.) amazonensis* não apresentaram diferenças significativas (Linares et al., 2000).

Os macrófagos também parecem desempenhar atividade na exarcebação da infecção em seus estágios iniciais através da produção de IL-10, uma citocina determinante no nível de susceptibilidade dos camundongos à infecção por *Leishmania*. O mecanismo utilizado pelas amastigotas para o estímulo à produção de IL-10 pelos macrófagos seria principalmente pela ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos. A opsonização dos parasitos por moléculas de imunoglobulina do tipo G (IgG) também parece ser necessária para um estímulo máximo à produção de IL-10 (Yang et al., 2007).

As DCs já foram descritas como hospedeiras para *L. (L.) amazonensis*, assim como os macrófagos. Essas células são capazes de fagocitar as formas amastigota ou promastigota metacíclica desse parasito sem a dependência de uma prévia opsonização destes por anticorpos ou pelo fator C3 do sistema complemento, ainda que somente as DCs que fagocitam parasitos opsonizados por anticorpos sigam para o processo de maturação celular. Assim, a fagocitose dos parasitos não-opsonizados ou opsonizados por fator C3 é benéfico para estes, permitindo seu estabelecimento no citoplasma das DCs e amplificação da infecção antes da ativação da resposta imune adaptativa (Prina et al., 2004).

Já se sabe do mesmo modo que as DCs de diferentes linhagens de camundongos interagem de forma distinta com a *L. (L.) amazonensis*: as DCs da linhagem C3H/HeJ (relativamente resistente à *Leishmania*) respondem à invasão por amastigotas produzindo IL-12, enquanto as DCs de BALB/c (susceptíveis à *Leishmania*) produzem IL-4, um citocina ligada a um tipo de resposta linfocitária que pode levar ao aumento da infecção (Qi et al., 2001).

As promastigotas de *L. (L.) amazonensis* apresentam peculiaridades em sua interação com as DCs: quando interagem com esse tipo celular em culturas de células de camundongo C57BL/6 são capazes de aumentar a expressão de marcadores de maturação celular de superfície, mas de uma forma mais branda que a expressão induzida por promastigotas de *L. (L.) major*. Considera-se então que essas DCs apresentam um perfil semiativado, o que dentre outros efeitos diminui sua capacidade de ativar linfócitos T auxiliares (CD4+) (Xin et al., 2007).

Contudo, as amastigotas de *L. (L.) amazonensis* apresentam uma capacidade mais efetiva de interferir no processo de maturação celular das DCs de C57BL/6 do que as promastigotas. Essa fase evolutiva leva a uma expressão ainda mais baixa

de marcadores de maturação celular de superfície (CD40 e CD83) e de citocinas também (IL-12p40 e IL-10), além de inibir mais eficientemente a capacidade dessas células de ativar linfócitos CD4+ (Xin et al., 2008).

Esse mesmo estudo indicou várias das vias de sinalização celular das DCs que foram subvertidas pela ação dos parasitos, incluindo: diminuição da fosforilação das proteínas STAT (*signal transducers and activators of transcription*) 1, 2 e 3, degradação do STATh2, e diminuição na expressão de fatores regulatórios de interferon 1 e 8 (Xin et al., 2008).

Os linfócitos NK aparentam desempenhar um papel no período inicial da infecção por *L. (L.) amazonensis*: em ensaios com a destituição desse tipo celular em camundongos BALB/c notou-se um aumento na carga parasitária em lesões cutâneas (Laurenti et al., 1999). Além disso, outros estudos demonstraram a capacidade de linfócitos NK lisar a *L. (L.) amazonensis* e de influenciar na resistência de macrófagos contra esses microorganismos (Aranha et al., 2005).

O sistema complemento parece ter ações contraditórias durante a infecção por esse parasito, pois enquanto alguns de seus componentes podem facilitar a invasão de células do sistema fagocitário mononuclear pela opsonização dos parasitos, esse sistema apresenta importância no controle da carga de parasitos nas lesões nas fases iniciais da infecção. Ensaio comparativo com camundongos BALB/c infectados que haviam sido destituídos ou não do sistema complemento demonstraram que os animais destituídos de sistema complemento apresentam respostas inflamatórias diminuídas e cargas parasitárias mais elevadas após 7 dias de infecção. A carga parasitária aumentada persistiu mesmo após 30 dias de infecção (Laurenti et al., 2004).

Sabe-se também que o sistema complemento possui a capacidade de eliminar promastigotas procíclicos de *Leishmania*, enquanto os promastigotas metacíclicos são resistentes à ação desse sistema (Zambrano-Villa et al., 2002).

Muito pouco foi reportado sobre a influência dos receptores *Toll-like* na progressão da infecção murina por *L. (L.) amazonensis*. Mas existem evidências de que essa classe de receptores possui de fato alguma importância nessa infecção, visto que, quando estimulados imunologicamente pela inoculação de adjuvantes específicos para TLR-4, concomitantemente com antígenos de parasitos *L. (L.) amazonensis*, uma elevada porcentagem (aproximadamente 60%) de camundongos BALB/c foram capazes de controlar a infecção num desafio posterior (Calvopina et al., 2006).

Adicionalmente, a mesma estimulação imunológica mostrou-se eficaz também em camundongos da mesma linhagem infectados previamente, pois 40% destes foram capazes de controlar a infecção. Esse efeito é dependente da produção de citocinas, como verificado pela presença de altos níveis de IFN- γ e discretos níveis de IL-4 nesses animais (Calvopina et al., 2006).

3.5. Características da resposta imune adaptativa na infecção experimental por *L. (L.) amazonensis* em camundongos

A resposta adaptativa contra protozoários é ativada em mamíferos, de uma forma geral, pela apresentação de antígenos por macrófagos ou DCs através de suas moléculas de MHC classe II ou linfócitos T CD4+. Além disso, macrófagos e DCs, juntamente com outros tipos celulares, também expressam moléculas de MHC classe I, que podem levar à ativação de linfócitos T citotóxicos (CD8+). Ainda pode haver a estimulação de linfócitos B para produzirem anticorpos específicos contra o parasito causador da infecção.

Nesse último caso, existem estudos demonstrando que ao invés do esperado efeito benéfico, a produção de anticorpos contra *Leishmania* pode estar associada a uma aumento da infecção. Esse efeito pôde ser observado em ensaios com camundongos geneticamente modificados que apresentam linfócitos B não-funcionais: esses animais, sem anticorpos circulantes, mostraram-se refratários à infecção por *Leishmania*, enquanto o grupo controle (com linfócitos B funcionais) foi suscetível (Kima et al., 2000).

Um efeito similar foi notado em animais que apresentavam anticorpos incompletos sem a cadeia- γ comum. Uma explicação proposta para esse efeito negativo dos anticorpos é a maior capacidade de parasitos opsonizados por IgG de induzirem macrófagos à produção de IL-10 (Yang et al., 2007).

Outro estudo, utilizando camundongos da linhagem JhD (os quais não possuem linfócitos B), mostrou mais uma vez os efeitos negativos da presença de anticorpos circulantes no controle da infecção por *L. (L.) amazonensis* e ainda sugeriu que as próprias células B podem apresentar efeitos negativos. A infecção experimental desses animais levou a lesões menores e com desenvolvimento mais lento do que em camundongos BALB/c, linhagem da qual os camundongos JhD foram originados (Wanasen et al., 2008).

De forma mais específica, este mesmo estudo indicou que os linfócitos B foram o principal tipo celular proliferando nos linfonodos drenantes das lesões, em

camundongos BALB/c, com uma taxa proliferativa muito mais elevada que linfócitos T CD4+ ou CD8+. Já em camundongos C3H, relativamente resistentes à infecção por *L. (L.) amazonensis*, não houve variação significativa entre as taxas de proliferação desses três tipos celulares. Esse efeito negativo dos linfócitos B foi explicado pela indução de migração celular para o sítio de infecção (aumentando o número potencial de células a serem colonizadas pelos parasitos) e pela ativação de linfócitos T CD4+ para a expressão de citocinas ligadas à aumento da infecção (Wanasen et al., 2008).

Conforme já mencionado em uma seção anterior, as células T CD4+ estão ligadas ao processo de ulceração das lesões na infecção por *L. (L.) amazonensis*. A evidência da importância desse tipo celular nesse processo específico foi obtida por ensaios com camundongos infectados da linhagem C.B-17/lcrJcl-scld, os quais apresentam imunodeficiência combinada severa: ao se injetar esplenócitos compatíveis provenientes de outros camundongos, as lesões desses animais passaram a apresentar ulceração, no entanto, ao retirar-se os linfócitos T CD4+ dos esplenócitos antes do inoculo esse processo não foi observado. O mesmo não foi observado quando as células retiradas eram CD8+ ou B220+ (linfócitos B), mostrando a especificidade desse tipo celular nesse processo (Terabe et al., 2000).

A ausência de linfócitos T CD4+ também já foi descrita como benéfica para o hospedeiro, uma vez que camundongos BALB/c destituídos desses linfócitos T (por tratamento com anticorpos monoclonais) apresentaram reduções no tamanho das lesões e na taxa de mortalidade, além de uma carga parasitária mais baixa e menor taxa de metástase de lesões (Silva et al., 1994).

Já os linfócitos T CD8+ são um dos principais componentes do infiltrado inflamatório presente no sistema nervoso central de camundongos das linhagens BALB/c ou *Swiss* (suíços; animais não-consaguíneos) (Abreu-Silva et al., 2003). Esse tipo de linfócitos é predominante em linfonodos drenantes de lesão em camundongos BALB/c, mas não em camundongos CBA (Alves et al., 2004).

O papel de proteção do hospedeiro durante a infecção por *L. (L.) amazonensis* exercido por linfócitos T CD8+ foi demonstrado por ensaios de vacinação/desafio associados à depleção de subgrupos específicos de linfócitos T. Nesses ensaios, observou-se que os mecanismos efetores dos linfócitos T CD8+ (produção de IFN- γ e perforinas) são necessários para uma eficiente resposta imune protetora contra os parasitos (Colmenares et al., 2003).

No entanto, contraditoriamente, os linfócitos T CD8+ já foram relacionadas ao aumento da patologia da infecção em camundongos C57BL/6, uma vez que quando eram submetidos a processos de depleção desse tipo celular, os animais apresentavam inflamações mais brandas, lesões menores e maior integridade tecidual (Hernández Sanabria et al., 2007).

O paradigma das respostas humorais de linfócitos T auxiliares dos tipos 1 e 2 (Th1 e Th2), cada uma caracterizada por um perfil específico de citocinas secretadas pelas linfócitos T, já foi bem estudado para infecções murinas por *L. (L.) major*. Sabe-se, portanto, que a resposta Th1 está associada ao controle da infecção, enquanto uma resposta Th2 em geral leva a uma aumento da mesma (Alexander & Bryson, 2005). Contudo, em estudos recentes, existe a sugestão de que a aumento da infecção pode ser causada também por outros tipos de resposta imune, como a atividade de linfócitos T regulatórios (Sacks & Noben-Trauth, 2002; Nylén & Sacks, 2007).

Essas atividades das respostas dos linfócitos T auxiliares estão relacionadas às suas características imunomodulatórias: enquanto a resposta Th1 direciona o sistema imune adaptativo contra patógenos intracelulares (como vírus ou parasitos *Leishmania*), a resposta Th2 direciona o sistema imune contra patógenos extracelulares, promovendo uma resposta baseada principalmente na produção de anticorpos, que não leva à ativação dos macrófagos. Assim, as ações imunológicas ligadas à resposta Th2 mostram-se ineficazes no combate a *Leishmania*, que estão colonizando o interior de células do sistema fagocitário mononuclear.

Não existe para infecções murinas causadas por espécies do complexo *L. (L.) mexicana*, como a *L. (L.) amazonensis*, uma definição tão clara do paradigma das respostas Th1/Th2. Ainda que a capacidade de montar uma resposta Th1 seja geralmente considerada indicativa de um fenótipo resistente, não se definiu precisamente se a susceptibilidade é devida a uma resposta Th2 predominante (Lemos de Souza et al., 2000), à ausência de uma resposta Th1 (Afonso & Scott, 1993; Buxbaum et al., 2003) ou a uma resposta com características Th1/Th2 (Ji et al., 2002; Sacks & Noben-Trauth, 2002).

Mas, mesmo a ligação da resposta Th1 com o fenótipo resistente a infecções por parasitos do complexo *L. (L.) mexicana* já foi contestada (Vanloubbeeck et al., 2004), ampliando ainda mais a indefinição das ações dessas respostas contra a infecção por parasitos desse complexo.

Apesar de classicamente os perfis de resposta Th1 e Th2 estarem associados a linfócitos T CD4+, sabe-se que os linfócitos CD8+ também são capazes de expressar citocinas relacionadas a ambos os perfis de resposta (Hernández-Ruiz & Becker, 2006; Subash et al., 1995), estando portanto aptas a serem as responsáveis pela determinação do tipo de resposta de linfócitos T na infecção.

3.6. Efeitos das citocinas e quimiocinas na infecção experimental por *L. (L.) amazonensis* em camundongos

A IL-4, uma importante citocina promotora da resposta Th2, foi descrita como um fator de susceptibilidade à infecção, pois camundongos BALB/c deficientes em IL-4 apresentaram níveis séricos elevados de IFN- γ e de IgG anti-*Leishmania* após duas semanas de infecção, quando comparados com camundongos BALB/c normais infectados (Guimarães et al., 2006).

Contudo, existe a sugestão de que a IL-4 não seria o fator de susceptibilidade predominante, pois ensaios de infecção com camundongos C57BL/6 tratados com anticorpos anti-IL-4 ou ainda com uma linhagem de camundongos C57BL/6 com o gene da IL-4 suprimido mostrou que esses animais ainda apresentam lesões sem cura espontânea. Além disso, mesmo em camundongos normais infectados a produção dessa citocina apresenta queda após a 3 semana (Jones et al., 2000; Jones et al., 2002; Ji et al., 2003).

A importância da IL-10, outra citocina usualmente relacionada à resposta Th2, na susceptibilidade de camundongos à infecção por *L. (L.) amazonensis* permanece não-definida. Ainda que essa citocina seja um importante fator limitante da resposta Th1 durante a fase aguda da infecção, o mesmo não é observado na fase crônica, uma vez que já foi demonstrado que a resposta Th1 permanece inibida nessa fase tardia da infecção mesmo em camundongos C57BL/6 deficientes de IL-10 (Jones et al., 2002).

Mas existem evidências de ações negativas dessa citocina para o hospedeiro: ensaios com camundongos BALB/c deficientes de IL-10 mostraram que esses animais apresentaram níveis aumentados de expressão de IFN- γ , IL-12 e NO quando comparados com animais controle. Contudo, quando esses animais foram submetidos a tratamento com anticorpos anti-IL4, eles passaram a ser capazes de controlar a infecção, apresentando menor carga parasitária nas lesões, demonstrando assim a ação conjunta de citocinas ligadas à resposta Th2 na modulação da susceptibilidade da infecção (Padigel et al., 2003).

Sugere-se que a IL-10 seria produzida pelos linfócitos T regulatórios (CD25+) ao invés dos linfócitos T ligados à resposta Th2 na infecção murina por *Leishmania*. Dessa forma, os efeitos de aumento da doença seriam causados pelos linfócitos T regulatórios (Sacks & Anderson, 2004).

A produção de IL-10 por linfócitos T regulatórios já foi de fato observada durante infecções de camundongos C57BL/6 por *L. (L.) amazonensis*, contudo sua ação não foi ligada a um aumento na susceptibilidade à infecção e sim a um mecanismo que impede a injúria tecidual pela resposta imune nos estágios iniciais da infecção (Ji et al., 2005).

A citocina IFN- γ , associada à resposta Th1, apresenta-se regulada negativamente em linfonodos de camundongos C57BL/6 infectados com *L. (L.) amazonensis* quando comparada com os níveis observados em camundongos infectados por *L. (L.) braziliensis*. Dessa forma, evidencia-se a existência de um mecanismo ainda não definido pelo qual a *L. (L.) amazonensis* é capaz de regular o sistema imune de seus hospedeiros de forma distinta de outras espécies de *Leishmania* (Maioli et al., 2004).

Ensaio conduzidos com camundongos C57BL/6 deficientes na produção de IFN- γ , indicaram que essa citocina não desempenha um papel crítico nos estágios iniciais da infecção, uma vez que não houve diferenças na progressão da infecção por *L. (L.) amazonensis* entre estes animais e o grupo controle. No entanto, essa citocina mostrou-se importante para os animais em estágios avançados da infecção, pois após dois meses os camundongos deficientes de IFN- γ apresentaram um desenvolvimento descontrolado das lesões com altas cargas parasitárias. Além disso, esses animais tinham altos níveis de IL-4 e baixos níveis de IL-12 e TNF- α , o que ressalta a importância do IFN- γ para a estruturação de uma resposta Th1 (Pinheiro & Rossi-Bergmann, 2007).

Um papel ambíguo também já foi proposto para o IFN- γ durante a infecção por *L. (L.) amazonensis*: quando não associado a outros fatores, essa citocina promove o aumento da proliferação de amastigotas no interior de macrófagos, ainda que, em paralelo, ative os macrófagos para a eliminação desses parasitos). Por outro lado, quando agindo sinergicamente com outros fatores, como lipopolissacarídeos, por exemplo, essa citocina induz eficientemente os macrófagos a limitar a replicação dos parasitos (Qi et al., 2004).

A expressão de IL-12, outra importante citocina ligada à resposta Th1, tem sido descrita como um importante fator para o controle da infecção por *L. (L.)*

amazonensis em camundongos. Esse parasito é capaz de regular negativamente a expressão dessa citocina em seus hospedeiros, conforme verificado em ensaios com camundongos C3HeB/FeJ (Jones et al., 2000).

Adicionalmente, nesse mesmo estudo, foi verificado que além de apresentarem redução na expressão de IL-12, esses animais foram não-responsivos a IL-12 exógena. Essa particularidade é resultante de um defeito na expressão das cadeias de ácido ribonucléico do tipo mensageiro (mRNA – *messenger ribonucleic acid*) codificadoras para o receptor IL-12 β 2, que estaria sendo regulada pelo parasita através de alguma via desconhecida (Jones et al., 2000).

A *L. (L.) amazonensis* também parece ser capaz de inibir a produção de IFN- γ , dependente de IL-12 em linfócitos, T CD4+ de uma forma diferente da observada para outras espécies de *Leishmania*. Ensaios *in vitro* com essas células infectadas por *L. (L.) amazonensis*, isoladas de camundongos C3HeB/FeJ, mostraram que quando estimuladas com antígenos na presença de IL-12, produzem apenas 10-15% da quantidade de IFN- γ produzida por células similares infectadas por *L. (L.) major* (Ramer et al., 2006).

Existem outras citocinas cujas análises das atividades durante a infecção murina por *L. (L.) amazonensis* ainda não foram realizadas, mas cujos papéis podem ser sugeridos por estudos com outras espécies de *Leishmania*.

Assim, sabe-se que a ação de TNF- α em infecções por *Leishmania sp.* ocorre pelo estímulo à produção de IgG por linfócitos B e na ativação de macrófagos para a eliminação dos parasitos, estando portanto associada ao controle da infecção (Hernández-Ruiz & Becker, 2006). Entretanto, essa citocina, associada a linfócitos T da resposta Th1 e macrófagos, apresenta outra atividade potencialmente nociva ao hospedeiro: em conjunto com a proteína inflamatória de macrófagos (MIP – *macrophage inflammatory protein*) ela estimula a migração de células de Langerhan infectadas, do sítio da lesão para o linfonodo drenante e, dessa forma, contribui para a disseminação da infecção (Arnoldi & Moll, 1998).

Por outro lado, a citocina IL-1 β , que é produzida por macrófagos, também já foi descrita como agindo sinergicamente com a MIP para produzir um efeito contrário (Arnoldi & Moll, 1998).

Outra citocina com potencial para desempenhar um importante papel nas infecções por *Leishmania* é a IL-13, relacionada à resposta Th2. Essa citocina, de forma similar a IL-4, IL-5 e IL-6 promove a produção de IgE e regula as reações de hipersensibilidade imediata (Matthews et al., 2000; Hernández-Ruiz & Becker, 2006).

Dessa forma, essa citocina pode atuar, de forma similar à IL-4, na susceptibilidade murina à infecção por parasitos do complexo *L. (L.) mexicana* (Alexander & Bryson, 2005).

As outras citocinas da família da IL-12, como IL-23 e IL-27, e as citocinas pró-inflamatórias, como a IL-18, têm o potencial de agirem de forma complementar à IL-12, reforçando a resposta Th1 no hospedeiro e auxiliando no controle da infecção (Von Stebut & Udey, 2004).

Além das citocinas, outras moléculas de sinalização do sistema imune, como as quimiocinas, estão envolvidas na resposta à infecção por *L. (L.) amazonensis*. Já foi relatado que uma série de quimiocinas e seus receptores apresentam sua expressão inibida durante a infecção por este parasito, sendo elas: CCL3/ MIP-1, CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, MIP-2, CCR-1, CCR2 e CCR-5 (Ji et al., 2003).

A inibição dessas moléculas é parte da estratégia de sobrevivência do parasito, visto que estas agem em sinergia com as citocinas para aumentar a atividade dos linfócitos contra a infecção (Teixeira et al., 2006). Um exemplo dessa atividade benéfica ao hospedeiro pelas quimiocinas é a descrição da ação anti-*Leishmania* do CXCL10: essa molécula ativa os macrófagos e diminui a taxa de progressão das lesões em camundongos C57BL/6, sendo que esses efeitos decorrem de sua ação no estímulo à produção de IL-12 e seus receptores (Vasquez & Soong, 2006; Vasquez et al., 2008). Assim, a CXCL10, e também a CCL2, reduz a carga parasitária em camundongos de uma forma dose-dependente (Vasquez & Soong, 2006).

4. Fatores de interação parasito-hospedeiro

4.1. Fatores de virulência em *Leishmania*

Como descrito anteriormente, a *Leishmania* possui a capacidade de controlar ou subverter a ação de diversos componentes do sistema imune de seus hospedeiros. Esses parasitos possuem diversos fatores, como enzimas ou derivados de glicanas, voltadas para suas interações com o hospedeiro: os fatores de virulência.

Basicamente, o conceito de fatores de virulência pode ser resumido como fatores que permitem ao parasito invadir e sobreviver em seu hospedeiro. Na *Leishmania*, existem quatro principais fatores de virulência já descritos: a glicoproteína de superfície principal (gp63), a lipofosfoglicana, a família de proteínas A2 e as enzimas da classe cisteína-proteinase (conforme revisado por Matlashewski, 2001):

- a gp63 apresenta atividades de proteção dos parasitos contra a ação de enzimas do intestino médio nos insetos vetores e dos fagolisossomas de macrófagos e fatores do sistema complemento no hospedeiro mamífero;
- a lipofosfoglicana é a mais abundante molécula presente na superfície de promastigotas. Ela desempenha papéis na fagocitose dos promastigotas por macrófagos e na proteção do parasito contra os processos de lise celular no interior destes;
- as proteínas da família A2 apresentam altos indices de expressão em amastigotas, estando inibidas em promastigotas. Essas proteínas aparentam ter importância na sobrevivência dos parasitos no interior de macrófagos, mas existem evidências de que não estão relacionadas à proliferação ou à manutenção da morfologia dos amastigotas;
- as cisteína-proteinases (CPs) de *Leishmania* são o foco de análise do presente estudo, em especial a cisteína-proteinase B (CPB), e são apresentadas mais detalhadamente na seção seguinte.

4.2. Cisteína-proteinases de *Leishmania*

O número de classificação das CPs designado pela *Enzyme Commission* (EC) é 3.4.22, indicando que são hidrolases com características de endopeptidases, ou seja, enzimas que atuam clivando ligações peptídicas internas a uma sequência de aminoácidos. As CPs caracterizam-se pelo seu mecanismo de ação hidrolítica através de um grupamento tiol nucleofílico de um resíduo de cisteína em uma tríade catalítica.

As CPs de *Leishmania* são agrupadas nas subfamílias das catepsinas B e L, integrantes da família C1 (papainas), que por sua vez pertence ao clã CA (Robertson & Coombs, 1993; Sakanari et al., 1997). Além dessa classe de endopeptidase, existem relatos de atividade de enzimas de outras classes em espécies de *Leishmania*, como serino-proteinases, metalo-proteinases e aspártico-proteinases (Alves et al., 2005).

A presença das enzimas dessas duas subfamílias já foi identificada em espécies de *Leishmania* relacionadas a casos de leishmaniose tegumentar ou visceral, estando presente possivelmente em todas as espécies e sendo necessárias nos processos de crescimento dos parasitos (Selzer et al., 1999).

A maior parte dos estudos publicados sobre as CPs é focada em três grupos dessas enzimas: CPA, CPB e CPC (Mottram et al., 2004). Tais grupos são

constituídos por diversas isoformas das enzimas (Robertson & Coombs, 1990) e cada um deles apresenta características que lhe são próprias:

- **CPA** – Constituído por enzimas da subfamília das catepsinas L. Esse grupo caracteriza-se por ser codificado por um gene de cópia única e pela ausência de uma longa extensão COOH-terminal antes de seu processamento final (Mottram et al., 1992; Mottram et al., 1998);
- **CPB** – Constituído por enzimas da subfamília das catepsina L. Esse grupo caracteriza-se por uma longa extensão COOH-terminal nas formas das enzimas antes de seu processamento final. Além disso, as enzimas CPB são expressas por genes com múltiplas cópias, organizados em sequências em *tandem*. Essas isoformas possuem variações entre suas especificidades por substratos e propriedades catalíticas (Brooks et al., 2001);
- **CPC** – Constituído por enzimas da subfamília das catepsinas B. Esse grupo, de forma similar ao grupo CPA, é codificado por um gene em cópia única e não apresenta uma extensão COOH-terminal como as enzimas CPB (Bart et al., 1995).

Contudo, o sequenciamento completo do genoma da *L. (L.) major* indicou a existência de diversas outras CPs distintas de CPA, CPB e CPC: encontrou-se genes capazes de codificar 56 CPs distintas, podendo ser organizadas em 13 famílias dentro de 4 clãs (Mottram et al., 2004).

Quanto a estudos sobre as CPs melhor definidas de *Leishmania*, já foram descritas variações nos níveis de transcrição de mRNA destas enzimas entre as duas formas morfológicas da *L. (L.) mexicana*: o gene de CPA é transcrito em altos níveis em promastigotas e amastigotas, os genes de CPB apresentam maior nível de transcrição em amastigotas do que em promastigotas e o gene da CPC apresenta maior nível de transcrição em promastigotas (Souza et al., 1992; Bart et al., 1995)

Ainda na *L. (L.) mexicana*, análises de genes indicaram a existência de 19 genes distintos codificadores para enzimas CPB. Dois dentre esses genes apresentam expressão predominante em promastigotas metacílicos, divergindo dos demais (Mottram et al., 1997). As diferenças de afinidade por substrato observadas entre as diversas isoformas da CPB são promovidas pela alteração de apenas uns poucos aminoácidos (Juliano et al., 2004).

Na *L. (L.) pifanoi*, pertencente ao complexo *L. (L.) mexicana*, os genes *cys1* e *cys2* que codificam CPs já foram descritos. O gene *cys1* apresenta-se em cópia

única, enquanto *cys2* integra uma família repetitiva de genes (indicando-o como codificador de CPB) (Traub-Cseko et al., 1993).

Ainda em outra espécie do mesmo complexo, a *L. (L.) amazonensis* também já foi descrito um gene codificador de CPs: *cys1*, sendo que esse apresenta similaridades com a CPA de *L. (L.) mexicana* (Lasakosvitsch et al., 2003).

CPs dos três grupos foram descritas em *L. (L.) major* (Mottram et al., 1998) e têm servido como base para a identificação desses mesmos grupos em outras espécies de *Leishmania*, como a *L. (L.) guyanensis* (Pascalis et al., 2003).

A presença de CPs no subgênero *Viannia* também já foi reportada, em especial em *L. (L.) braziliensis*. Embora a caracterização dessas enzimas ainda esteja em fases iniciais, já se sabe que a CPB de *L. (L.) braziliensis* apresenta diferenças em suas afinidades a substratos com relação à CPB de *L. (L.) mexicana* e que possivelmente encontra-se ancorada à superfície do parasito por âncora de glicosilfosfatidilinositol (Alves et al., 1993; Lanfranco et al., 2008; Rebello et al., 2009).

Quanto à descrição dessas enzimas em espécies causadoras de leishmaniose visceral, já foram descritos os genes *cys1* e *cys2* de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi*, cujas sequências mostram similaridades com os genes de mesmo nome de *L. (L.) pifanoi*, sendo gene *cys1* indentificado como codificador de CPB e o gene *cys2* codificador de CPA. Observou-se que o gene *cys1* é mais transcrito em amastigotas, enquanto o gene *cys2* apresenta expressão em ambas as morfologias do parasito (Omara-Opyene & Gedamu, 1997). No entanto, outros estudos mostram resultados contraditórios indicando que o gene *cys2* seria regulado para uma maior expressão em amastigotas (Mundodi et al., 2005).

Além disso, os polimorfismos de nucleotídeo único observado nos genes de CPB de *L. (L.) donovani* foram apontados como potencialmente relacionados à diferenças de status dermatrópico e viscerotrópico desses parasitos, sendo a extensão COOH-terminal indicada como principal responsável pela variabilidade genética (Hide & Bañuls, 2008).

4.3. Cisteína-proteinases como fatores de virulência

A importância dos fatores de virulência apresenta distinções entre as diversas espécies de *Leishmania*. Nas infecções por *L. (L.) major*, a lipofosfoglicana e os antígenos LACK (*Leishmania homologue of receptors for activated C-kinase*) parecem ser fatores-chave para a virulência desse parasito em camundongos

BALB/c; com a lipofosoglicana subvertendo as atividades migratórias das células do hospedeiro e o LACK induzindo essas à produzir IL-4 (Späth et al., 2003; Julia et al., 1996). Já para a *L. (L.) mexicana*, existem diversos estudos que apontam as CPs como os principais fatores de virulência envolvidos, em especial a CPB. Um indício inicial da importância dessas enzimas é a eficácia observada pelo tratamento com inibidores de CPs para o controle da infecção por esses parasitos em ensaios *in vitro* e *in vivo* (Selzer et al., 1999).

Evidências mais precisas da importância da CPB para a virulência da *L. (L.) mexicana* foram obtidas em ensaios de infecção murina, na linhagem BALB/c, utilizando cepas de parasitos geneticamente modificados, tendo os genes das enzimas CPA, CPB e CPC suprimidos (cepas Δcpa , Δcpb e Δcpc). Os resultados desses ensaios demonstraram efeitos mais discretos na capacidade infectiva dos parasitos Δcpa e Δcpc , enquanto, os parasitos Δcpb tiveram sua capacidade infectiva fortemente reduzida, promovendo menos lesões nos camundongos do que os parasitos da cepa selvagem (Mottram et al., 1997; Alexander et al., 1998).

Estudos posteriores analisaram os efeitos da reinserção dos genes codificadores para CPB na cepa Δcpb : a reinserção de uma cópia única de gene *cpb* nesses parasitos não restaurou sua virulência, sendo que somente a reinserção de múltiplos genes codificadores dessa enzima levou esses parasitos a apresentarem virulência similar aos da cepa selvagem. Esses dados sugerem que os genes *cpb* em múltiplas cópias levam à produção de enzimas com funções complementares (Denise et al., 2003).

O papel da CPB na infecção de diferentes linhagens murinas apresenta distinções: mesmo com a supressão dos gene *cpb*, *L. (L.) mexicana* continuou capaz de promover continuamente lesões em camundongos BALB/c, ainda que com uma diminuição na taxa de progressão destas lesões em relação à cepa selvagem, contudo, em outras linhagens de camundongos como C3HeB/FeJ e C57BL/6, os parasitos Δcpb foram eventualmente controlados e as lesões curadas (Alexander et al., 1998; Buxbaum et al., 2003; Denise et al., 2003). Em testes *in vitro*, amastigotas da cepa Δcpb apresentaram taxas de infectividade comparáveis aos da cepa selvagem (Frame et al., 2000), enquanto os parasitos Δcpc demonstraram menor capacidade de sobrevivência no interior de macrófagos (Bart et al., 1997; Mottram et al., 1998).

A existência de uma sinergia entre as CPs contribuindo para a virulência de *L. (L.) mexicana* foi verificada em ensaios com parasitos com uma combinação de

genes de CPs suprimidos ($\Delta cpa/ \Delta cpb$). Esses mutantes apresentaram nível de infectividade ainda mais baixos em camundongos BALB/c do que as cepas com apenas um dos tipos de CPs sumprimidas, indicando a complementariedade dessas CPs para a virulência dos parasitos (Alexander et al., 1998).

A redução na virulência de *L. (L.) mexicana* pela supressão de genes de CPs também já foi observada para outros modelos de estudo como hamsters ou células do sistema fagocitário mononuclear humano (Saravia et al 2006).

Em parasitos de outra espécie desse mesmo complexo, *L. (L.) amazonensis*, já foi descrito que as cepas mais virulentas são aquelas que apresentam um índice mais elevado na expressão de CPs (de Araújo Soares et al., 2003).

A importância da CPA (*cys1*) de *L. (L.) donovani* para a virulência desse parasito foi observada em ensaios baseados em uma estratégia similar à utilizada nos estudos com *L. (L.) mexicana*: a supressão gênica. Assim, observou-se queda na capacidade infectiva desse parasito em hospedeiros mamíferos ou em suas células *in vitro* nos mutantes $\Delta Licpa$ (Denise et al., 2006).

Existem indícios também de algumas atividades imunoregulatórias da CPC de *L. (L.) chagasi*, como sua capacidade de induzir à expressão de TGF- β em células humanas em cultura (Somanna et al., 2002).

Assim como para *L. (L.) mexicana*, a supressão de genes de CPs acarretou uma queda de virulência de *L. (L.) infantum* em outros modelos não-murinos, como hamsters (Poot et al., 2006) e de *L. (L.) chagasi* em linhagens de células humanas (Mundodi et al., 2005).

4.4. Efeitos da CPB no equilíbrio das respostas Th1/Th2

A literatura científica aponta para diversas evidências de que a CPB é uma 'ferramenta' utilizada pelos parasitos *Leishmania* para subverter diversas das funções do sistema imune dos hospedeiros mamíferos, estando tais efeitos melhor descritos para parasitos do complexo *L. (L.) mexicana*.

Essa ação sobre o sistema imune ocorre no sentido de alterar o equilíbrio entre as respostas Th1/Th2, a fim de favorecer o tipo de resposta que é mais vantajoso para a sobrevivência dos parasitos e disseminação da infecção: a resposta Th2 (Alexander & Bryson, 2005).

Uma clara indicação da importância da CPB para esse tipo de controle do parasito sobre o hospedeiro mamífero pode ser observada na incapacidade da *L. (L.) mexicana* Δcpb de promover a expressão de IL-4 na infecção experimental de

camundongos BALB/c, permitindo que estes estruturam uma resposta Th1 e, dessa forma, limitem as lesões. Ao se reinserir múltiplos genes de CPB pela transfecção com um cosmídeo, estes parasitos recuperaram a capacidade de induzir à expressão de IL-4 nos camundongos de forma comparável aos parasitos do tipo selvagem (Denise et al., 2003).

É interessante notar que esse mecanismo de subversão imune tem diferenças para a mesma espécie de parasito atuando em diferentes linhagens de camundongos consanguíneos. Assim, já foi reportado que em animais das linhagens C3HeB/FeJ e C57BL/6, a virulência da *L. (L.) mexicana* não está associada a um estímulo para a expressão de IL-4, e sim a inibição da expressão de citocinas associadas à resposta Th1. Nesse caso, verificou-se que em infecções experimentais com parasitos Δcpb , animais dessas duas linhagens conseguem controlar o desenvolvimento das lesões por uma resposta Th1, mas animais dessas mesmas linhagens com o gene para IL12p40 suprimido mostram-se susceptíveis à esses parasitos modificados (Buxbaum et al., 2003).

O uso de cosmídeos para se inserir múltiplos genes de CPB de *L. (L.) mexicana*, conforme citado anteriormente, também levou a resultados interessantes em um sistema mais artificial: *L. (L.) major* transfectada com esses genes foi capaz de promover infecções com carga parasitária mais elevada e com diminuição na expressão de IFN- γ em camundongos C3HeB/FeJ, quando comparada a infecções por *L. (L.) major* selvagem (Buxbaum et al., 2003).

A CPB também está ligada à capacidade da *L. (L.) mexicana* de inibir a produção de IL-12 por algumas células do hospedeiro, como macrófagos e células dendríticas (Weinheber et al., 1998; Bennett et al., 2001). A importância da CPB nesse processo foi comprovada após ensaios com amastigotas Δcpb , nos quais estes mostraram menor eficiência para inibir a expressão dessa citocina em células de camundongo em cultura, após indução por lipopolissacarídeos, do que as amastigotas do tipo selvagem. Uma prova adicional advém da observação de que inibidores de CPB foram capazes de reverter a ação das amastigotas do tipo selvagem (Cameron et al., 2004).

Nesse mesmo estudo foi proposto o mecanismo de ação pelo qual a CPB estaria inibindo a expressão da IL-12 por estas células: essa enzima estaria clivando diretamente o fator de transcrição kappa B (NF- κ B – *nuclear factor kappa B*) e seus inibidores (I κ B α e β), impedindo assim um correto funcionamento do sistema de expressão gênica das células do hospedeiro. Tal efeito não foi observado para

parasitos *Δcpb* ou para promastigotas, as quais expressam baixos níveis de CPB (Cameron et al., 2004).

Outro efeito direto da CPB sobre as respostas tipo Th por atividades proteolíticas ocorre na atuação dessa enzima sobre moléculas de MHC: existem evidências de que a CPB de *L. (L.) amazonensis* é capaz de clivar moléculas de MHC classe II no vacúolo parasitóforo em células do hospedeiro colonizadas. Assim, a resposta imune do hospedeiro poderia ser parcialmente inibida ou conduzida por outros componentes como moléculas de MHC classe I (de Souza Leão et al., 1995).

A atividade da CPB sobre o sistema imune de camundongos também já foi testada em um sistema sem a presença de infecção por *Leishmania*. Nesse caso, uma forma recombinante de CPB, que se apresentava enzimaticamente ativa, foi inoculada subcutaneamente no coxim plantar de camundongos BALB/c. Os resultados indicaram que, mesmo sem parasitos presentes, os animais apresentavam aumento na expressão de IL-4 e IL-5, indicando a organização de uma resposta Th2, e também nos níveis de IgE circulantes. Esses efeitos podem ser parcialmente explicados pela capacidade dessa enzima de clivar CD23 (receptor de IgE de baixa afinidade) e CD25 (receptor de IL-2), uma vez que o uso de enzimas recombinantes sem atividade proteolítica não apresentou esses mesmos efeitos (Pollock et al., 2003).

4.5. A extensão COOH-terminal da CPB e o sistema imune do hospedeiro

Além das descrições de atividades da CPB sobre o sistema imune do hospedeiro por ação hidrolítica, sua extensão COOH-terminal também já foi reportada como altamente imunogênica e como potencial fator influenciando a evolução da infecção por *L. (L.) amazonensis* (Alves et al., 2004), por *L. (L.) infantum* (Nakhaee et al., 2004) e por *L. (L.) donovani* (Hide & Bañuls, 2004).

Considerando que durante o processamento da CPB da *Leishmania sp.* para sua forma madura, a extensão COOH-terminal é hidrolisada (Duboise et al., 1994) e secretada para o ambiente extracelular (Traub-Cseko et al., 1993), e que esse polipeptídeo já foi observado no citoplasma de células do hospedeiro (Alves et al., 2005), pode-se considerar que esse fragmento estará disponível para a interação com o sistema imune do hospedeiro.

Em um estudo anterior de nosso grupo, foi realizada uma reconstrução tridimensional da extensão COOH-terminal de CPB da *Leishmania* pelo uso de técnicas de modelagem molecular. Nessa análise, um modelo estrutural de papaína

construído *in silico* foi utilizado, devido ao alto grau de similaridade dessa enzima com as CPs de *Leishmania*, e combinado com um modelo da extensão COOH-terminal, construído a partir das sequências primárias das extensões COOH-terminal de *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) pifanoi*. O modelo final demonstrou a existência de porções organizadas em α -hélice e de porções com estrutura linear, indicando a possibilidade de existência de epitopos lineares de linfócitos T na estrutura do fragmento COOH-terminal (Alves et al., 2001a).

Um estudo subsequente permitiu a descrição de três sequências de aminoácidos derivadas das mesmas extensões COOH-terminal de CPB utilizadas no estudo anterior cujas características físico-químicas, como carga elétrica, hidrofobicidade e ponto isoelétrico, as tornavam adequadas para a interação com moléculas de antígeno leucocitário humano (HLA – *human leukocyte antigen*) classe II (pI: aminoácidos 361 a 370; pII: 415-422 e pIII: 431-444). Esses epitopos preditos foram sintetizados e utilizados em ensaios *in vitro* com células mononucleares da circulação periférica de pacientes com leishmaniose e, de fato, demonstraram a capacidade de estimular a proliferação dessas células em cultura (Alves et al., 2001b).

Por fim, o uso desses mesmos epitopos preditos em ensaios com camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* demonstrou a capacidade de um deles (pI: VMVEQVICFD) de induzir uma resposta imune com características Th2 em camundongos BALB/c e com características mescladas Th1/Th2 em camundongos CBA. Os camundongos BALB/c demonstraram aumento das lesões quando vacinados com pI previamente a um desafio de infecção, o que não ocorria em animais da outra linhagem testada. Além disso, enquanto as células de linfonodo de camundongos BALB/c infectados respondiam à incubação *in vitro* com pI aumentando a produção de somente IL-4, as células de CBA respondiam aumentando a produção de IL-4 e IFN- γ , além de produzirem NO. Entretanto, houve também respostas similares entre as culturas de células das duas linhagens: pI estimulou a proliferação em ambas, sendo os linfócitos T CD8+ o fenótipo predominante (Alves et al., 2004).

JUSTIFICATIVA

O presente estudo visa dar continuidade à análise da influência da enzima CPB (e sua extensão COOH-terminal) no equilíbrio das respostas Th1 e Th2 no modelo experimental murino, levando adiante o desenho racional dos estudos prévios de nosso grupo.

Essa proposta é baseada na atual disponibilidade de algoritmos *online* que permitem, teoricamente, uma definição mais precisa dos epitopos de linfócitos T presentes em sequências de aminoácidos e, dessa forma, podem indicar novos e mais potentes epitopos da extensão COOH-terminal de CPB, os quais poderiam não ter sido detectados pelas metodologias de análises de características físico-químicas utilizadas anteriormente.

Adicionalmente, a evolução da ferramenta computacional de *Molecular Docking* para analisar a interação de moléculas mais complexas também foi considerada como vantajosa para nosso estudo. Em seu presente estado de desenvolvimento, essa metodologia tem o potencial de permitir, quando aplicada em conjunto com os ensaios *in vivo* e *in vitro*, dissecar as prováveis características de interação entre os epitopos de linfócitos T selecionados e as moléculas de MHC às quais estes se ligam. Essa análise dos padrões de interações existentes torna possível a visualização de arquétipos de epitopos associados a determinados tipos de reação do sistema imune.

Por fim, o domínio de técnicas de biologia molecular foi percebido como uma oportunidade de se obter a sequência completa da extensão COOH-terminal de CPB da *L. (L.) amazonensis*, permitindo assim a análise dos epitopos específicos dessa espécie nos ensaios, e, igualmente, de se verificar os níveis de transcrição de mRNA de moléculas associadas à virulência do parasito e de moléculas associadas à respostas imune do hospedeiro, gerando dados complementares às informações sobre a expressão e interação dessas moléculas já reportadas na literatura científica.

O amplo avanço metodológico das técnicas de análise computacional e biologia molecular nos últimos anos nos indicou um caminho para aprofundar nossa linha de pesquisa sobre esse patógeno, cuja importância nas questões de saúde pública de nosso país vem crescendo, visando uma melhor compreensão dos processos de interação parasito-hospedeiro.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avaliar os fatores associados à interação hospedeiro-parasito, no modelo de infecção experimental murina com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

2. Objetivos específicos

1. Sequenciar a extensão COOH-terminal da CPB da *L. (L.) amazonensis*;
2. Mapear epitopos preditos de linfócitos T na extensão COOH-terminal da *L. (L.) amazonensis*;
3. Avaliar o potencial dos epitopos preditos de influenciar no desenvolvimento de lesões nas infecções experimentais;
4. Determinar o fenótipo dos linfócitos T murinos predominantemente induzido pelos epitopos preditos, em culturas de células de linfonodo;
5. Avaliar a indução da expressão das citocinas IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- γ e do óxido nítrico pelos epitopos preditos nas células de linfonodo em cultura;
6. Determinar as características das interações entre os epitopos selecionados e moléculas de MHC;
7. Determinar a expressão quantitativa do mRNA de enzimas ligadas à virulência da *L. (L.) amazonensis* (CPB e CPC) durante o processo de evolução da infecção;
8. Determinar a expressão quantitativa do mRNA de moléculas ligadas à resposta imune adaptativa (MHC classes I e II) no hospedeiro murino durante o processo de evolução da infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Cultivo de parasitos

L. (L.) amazonensis cepa MHOM/BR/77/LTB0016 (obtida da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz – CLIOC/IOC – Fiocruz) foram utilizados nesse estudo. Para a manutenção da cepa em laboratório, promastigotas infectivos foram periodicamente inoculados em camundongos BALB/c e, posteriormente, amastigotas foram isolados das lesões desses animais e criopreservados em meio infusão de coração e cérebro (BHI – *brain heart infusion*; Sigma-Aldrich Chemical Co., EUA) suplementado com 30% de soro fetal bovino (SFB – Gibco, Invitrogen, Brasil) e 8% de glicerol (Sigma-Aldrich Chemical Co., EUA) por imersão em nitrogênio líquido até o uso em cultura.

Para os ensaios *in vivo* e *in vitro*, promastigotas foram obtidos por cultivo em meio Schneider (Sigma-Aldrich Chemical Co., EUA) suplementado com 10% de SFB por 4 dias a 28 °C. Após esse período, os parasitos em fase logarítmica de crescimento foram lavados 3x por centrifugação (2.000 xg, 10 min, 4 °C) em salina tamponada por fosfato (PBS – *phosphate buffered saline*) pH 7,2, contados em câmara de Neubauer e resuspensos em PBS para uso futuro.

2. Camundongos e infecção experimental

Todos os ensaios com o uso de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Fiocruz (Licença: L-0006/07). No presente estudo, foram utilizados camundongos fêmeas livres de patógenos específicos de duas linhagens isôgenicas com níveis distintos de susceptibilidade à infecção por *L. (L.) amazonensis*: BALB/c (muito susceptível) e CBA (médio-resistente). As linhagens de camundongos utilizadas apresentam haplotipos distintos para as moléculas de H-2: BALB/c – haplotipo d e CBA – haplotipo k.

Para os ensaios de infecção experimental, camundongos de 5 a 7 semanas de idade obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL)/Fiocruz foram inoculados subcutaneamente no coxim plantar do membro inferior esquerdo com $1,0 \times 10^6$ promastigotas infectivos resuspensos em PBS (50 μ L – $2,0 \times 10^7$ céls/mL). O estado dos animais foi acompanhando semanalmente até sua eutanásia em câmara de CO₂. A área de lesão (em mm²) foi estimada pelo uso de um

paquímetro analógico, medindo-se a altura e largura das patas inoculadas de três animais aleatórios por grupo de animais infectados.

3. Sequenciamento da extensão COOH-terminal de CPB de *L. (L.) amazonensis*

Para se determinar a correta sequência de aminoácidos da extensão COOH-terminal de CPB foi realizado o sequenciamento da cadeia de ácidos nucléicos correspondente a essa região da enzima. Com este fim, foi extraído, pelo uso do *kit Wizard Genomic DNA purification* (Promega Corporation, EUA), o DNA total de 10^8 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em fase de crescimento logarítmico. Após a verificação da integridade do material extraído, por eletroforese em gel de agarose (Sigma-Aldrich Chemical Co., EUA) a 0,8% corado por brometo de etídeo a 0,02 $\mu\text{L/mL}$ (Promega Corporation, EUA) e visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta, procedeu-se ensaio de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação da região de interesse.

O ensaio de PCR foi realizado utilizando-se um par de iniciadores previamente desenhados para a amplificação da extensão COOH-terminal da CP Lpcys2 de *L. (L.) pifanoi*: iniciador senso - 5'-GGATCCGCACCCAGACCCGTGATG-3' e iniciador antisenso - 5'-AAGCTTCTACGTGTAGTGACAGGT-3' (Marin-Villa et al., 2008), e o *kit PCR Core System* (Promega Corporation, EUA). As condições de termociclagem utilizadas nos ensaios de PCR (realizados em um termociclador Mastercycler - Eppendorf International, EUA) foram: etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 1 min (1 ciclo), 40 ciclos de desnaturação (95 °C por 1 min), hibridização (60 °C por 30 seg) e extensão (72 °C por 1 min) e etapa final de extensão a 72 °C por 5 min. Os produtos dos ensaios de PCR foram visualizados, como descrito acima, em gel de agarose a 1%.

A banda única visível no gel de agarose foi extraída utilizando-se o *kit Wizard SV and PCR Clean-Up system* (Promega Corporation, EUA), sendo então inserida no vetor *pGEM-t Easy Vector* pelo uso do *kit* respectivo (Promega Corporation, EUA). O vetor utilizado confere às bactérias transformadas resistência ao antibiótico ampicilina e a capacidade de processar 5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosídeo (X-gal) pela expressão de β -galactosidade (gene lacZ), estando o sítio de ação das enzimas de restrição para inserção da sequência-alvo localizado dentro da seqência do lacZ (Figura 1).

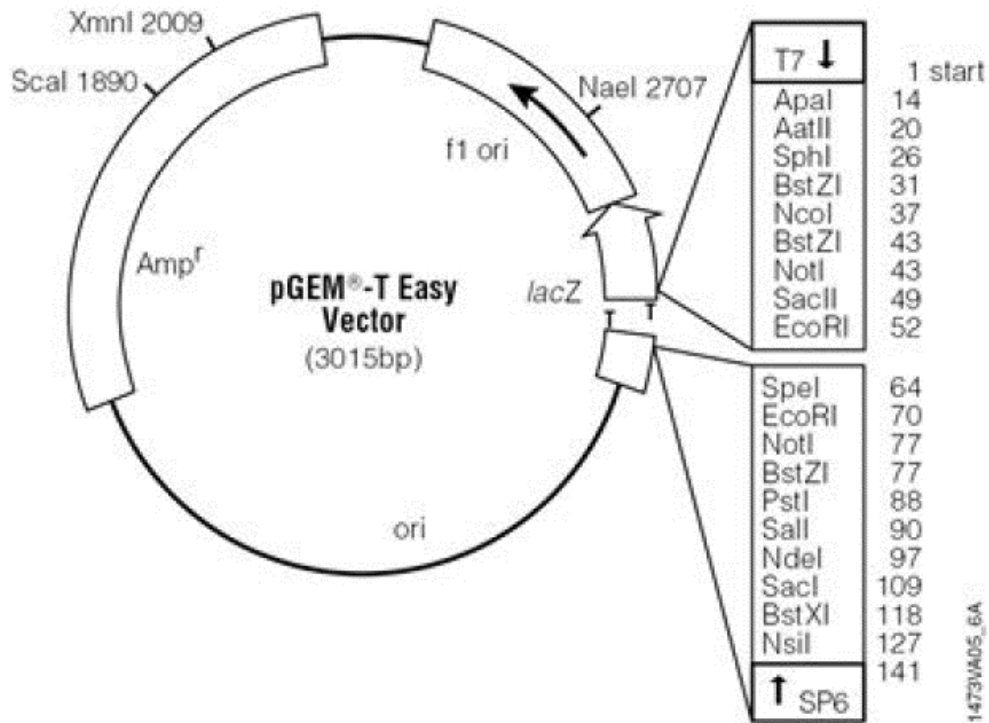


Figura 1 – Ilustração representativa do vetor pGEM-T Easy (Promega), utilizado nos ensaios de sequenciamento da extensão COOH-terminal da CPB de *L. (L.) amazonensis*. As regiões dos genes de resistência à ampicilina (AMP^r) e do gene de expressão da β -galactosidase (*lacZ*) estão indicadas na ilustração, assim como a região da sequência *lacZ* onde ocorre a ação de enzimas de restrição (quadro lateral). Fonte: www.promega.com

Células competentes de *Escherichia coli* cepa *Top 10*, previamente criopreservadas a -70 °C, foram transformadas pelo método do choque térmico utilizando-se o vetor contendo a sequencia-produto do ensaio de PCR: às alíquotas de cultura de bactérias (50 µL) foram adicionadas alíquotas dos vetores (10 ng) e estas foram mantidas em banho de gelo até descongelarem.

Após o descongelamento, procedeu-se o choque térmico, sendo as alíquotas de bactérias incubadas em banho-maria a 42 °C por 45 seg e, então, novamente colocadas em banho de gelo. As culturas de bactérias foram ressuspensas (volume final 1 mL) em meio SOC (Sigma-Aldrich Chemical Co., EUA) e incubadas a 37 °C por 1,5 h sob agitação (150 rpm).

Ao final desse período, uma fração (100 µL) das culturas de bactérias foi semeada em placas de Petri recobertas com meio LB (Luria-Bertnani)-agar (LGC do Brasil) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich Chemical Co., EUA), 40 µg/mL de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG; Invitrogen, Life Technologies, EUA) e 40 µg/mL de X-gal (Invitrogen, Life Technologies, EUA) e espalhadas por esgotamento, sendo incubadas a 37 °C por 24 h para o crescimento das colônias. Somente as colônias de coloração esbranquiçada, indicando a provável transformação por vetores contendo o inserto foram utilizadas nas etapas seguintes. As colônias selecionadas foram semeadas em meio LB (LGC do Brasil) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e incubadas a 37 °C por 24h sob agitação (150 rpm). Ensaio controle de transformação de bactérias foram realizados com vetores sem inserto.

As culturas de bactérias transformadas foram então submetidas a um mini-prep para a purificação dos vetores clonados. As bactérias foram centrifugadas (5.500 xg, 10 min, 25 °C) e ressuspensas em 400 µL de STET [8% de sacarose (Sigma-Aldrich Chemical Co., EUA), 10mM Tris-HCl pH 8.0, 50 µM de ácido etilenodiamino tetraacético (Sigma-Aldrich Chemical Co., EUA) pH 8.0 e 5% de Triton X-100 (Biosolve Chemicals, EUA)] acrescido de lisozima (1 mg/ml - Sigma-Aldrich Chemical Co., EUA) e de RNase A (5 µg/mL - Invitrogen, Life Technologies, EUA).

Seguiu-se a fervura da suspensão por 3 min, nova etapa de centrifugação similar, descarte do pellet e adição de álcool isopropílico (1:1). A mistura foi centrifugada nas mesmas condições e o *pellet* lavado em sequência com álcool etílico gelado (Merck, Brasil) a 70% e 100%, sendo então seco em estufa a 37 °C e resuspenso em água deionizada. (50 µL).

Alíquotas dos vetores purificados foram submetidas à ação de enzimas de restrição (Bam HI e Hind III – Promega Corporation, EUA) e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, observando-se que os vetores tratados apresentavam no gel uma banda de tamanho compatível com a obtida nos ensaios de PCR iniciais.

As alíquotas restantes dos vetores purificados foram então utilizadas em reações de precipitação [incubadas com 6,5% de polietileno glicol 8000 (Promega Corporation, EUA) e 0,4M de NaCl (Sigma-Aldrich Chemical Co., EUA) em banho de gelo por 20 min), centrifugadas nas mesmas condições anteriores e os pellets lavados em sequência com álcool etílico gelado a 70% e 100%, com posterior resuspensão em água deionizada.

Estas amostras de vetores purificadas e precipitadas foram usadas em reações de sequenciamento da cadeia de ácidos nucleicos. Para a realização dessas reações, foi utilizado o iniciador específico para o promotor T7 (Promega Corporation, EUA).

Todas as reações de sequenciamento foram realizadas pela Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/Fiocruz, utilizando-se o sequenciador 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA).

Os resultados e a qualidade das sequências foram avaliados utilizando-se o *software BioEdit Sequence Alignment Editor*, sendo as sequências resultantes analisadas pela ferramenta *online NCBI Basic Alignment Search Tool [BLAST]* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para se verificar a similaridade com outras sequências já descritas de *Leishmania*.

Por fim, a sequência de DNA obtida foi convertida em sequência de aminoácidos pelo uso da ferramenta *online ExPASy translate tool* (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>). Para a definição da porção NH₂-terminal (inicial) de nossa sequência de interesse, utilizamos como base os resultados publicados sobre a descrição da extensão COOH-terminal de CP de *L. (L.) pifanoi* (Traub-Cseko et al., 1993).

4. Estratégia de seleção *in silico* de epitopos

Para a seleção de epitopos preditos capazes de ligarem a moléculas de H-2 derivados da extensão COOH-terminal de CPB de *L. (L.) amazonensis* foram utilizados algoritmos disponíveis *online*.

Os algoritmos eleitos podem ser divididos em duas classes: algoritmos para a simulação da clivagem proteassômica dos epitopos (NetChop - www.cbs.dtu.dk/services/NetChop e PAPrOC - www.paproc.de) e algoritmos para a avaliação da capacidade de epitopos de interagirem com a fenda da molécula de MHC (SYFPEITHI - www.syfpeithi.de).

Essas classes de algoritmos foram selecionadas e utilizadas em conjunto nesse estudo com o objetivo de se obter uma melhor simulação do processamento natural dos epitopos ligantes a moléculas de H-2, visto que os mesmos têm sua porção COOH-terminal definida pela ação de proteassomas previamente à sua interação com moléculas de MHC (Nussbaum et al., 2001).

Apesar dos algoritmos de predição de clivagem proteassômica terem sido desenvolvidos especificamente para simular a ação de proteassomas humanos, estas ferramentas puderam ser utilizadas para prever a ação de proteassomas murinos, devido ao alto grau de conservação dessas estruturas (Voges et al., 1999).

Para nossas análises, utilizamos esses algoritmos com seus ajustes padrões e, no caso do PAPrOC, realizamos a predição da ação dos 3 tipos de proteassomas humanos disponíveis à época do uso. Nas predições de ligação de epitopos a moléculas de MHC pelo algoritmo SYFPEITHI, somente foram analisadas moléculas de H-2 classe I, especificamente do H-2K, mas para distintos haplotipos de camundongos: b, d e k. Nestas predições, foram considerados todos os oligômeros de tamanho compatível com as fendas das moléculas de MHC ensaiadas.

Como critério de seleção (*cutoff*), utilizou-se um valor de escore igual a 10, pois, de acordo com as informações disponibilizadas no guia de uso do algoritmo, esse valor indica a possibilidade de existência de pelo menos um aminoácido-âncora principal, o que é essencial para um correto acoplamento do epitopo na fenda da molécula de MHC.

Por fim, os resultados retornados por todos os algoritmos foram agrupados e comparados e somente os epitopos preditos presentes na região de intersecção de todos os conjuntos de dados foram selecionados para os ensaios *in vivo* e *in vitro*.

Em paralelo, a mesma metodologia de seleção de epitopos foi realizada com sequências de extensões COOH-terminal de CPB de outras espécies de *Leishmania* obtidas no banco de dados UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>), pelo uso da ferramenta *basic alignment search tool* (BLAST), com os ajustes padrões, e tendo como sequência de busca a sequência de aminoácidos da extensão COOH-terminal de CPB de *L. (L.) amazonensis*.

5. Síntese e análise dos epitopos preditos

Após a seleção dos epitopos de interesse, os mesmos foram quimicamente sintetizados pela empresa ThuraMed, Creosalus (EUA) com grau de pureza de 95% (confirmado por HPLC – *high performance liquid chromatography*) e com massa molecular compatível com o valor previsto (confirmada por ES-MS – *electron spray mass spectrometry*).

Os epitopos preditos sintetizados foram diluídos em dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich Chemical Co., EUA) e estocados a -70 °C. Todos os epitopos foram testados para a presença de endotoxinas, utilizando-se o *kit Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000* (Lonza, EUA), conforme as instruções do fabricante.

Resumidamente, alíquotas de 50 µl das soluções controle e padrões do *kit* ou das soluções de epitopos preditos (a 30 µg/mL em PBS) foram transferidas para tubos de ensaio (em duplicatas) e adicionou-se 50 µl da solução de lisado de amebócito de límulo, incubando-se por 10 min à 37 °C. Decorrido esse tempo, adicionou-se 100 µl da solução substrato e incubou-se as misturas por 6 min a 37 °C. Por fim, adicionou-se 100 µl do reagente de parada e a absorbância das misturas foi avaliada a 405 nm em espectrofotômetro Ultrospec 1100 (Amersham Biosciences, GE Healthcare, EUA).

6. Vacinação com os epitopos preditos sintetizados

Para se avaliar os efeitos da vacinação com os epitopos preditos antes do desafio da infecção experimental com *L. (L.) amazonensis* na progressão das lesões em camundongos BALB/c ou CBA, o protocolo a seguir foi aplicado:

Três semanas antes da infecção experimental, como descrita no item 2, os animais foram inoculados com os epitopos preditos (100 µg) emulsificados em 100 µL de adjuvante de Freund completo (Sigma-Aldrich Chemical Co., EUA). Para cada epitopo hipotético, três animais foram inoculados. Na semana seguinte, esses mesmo animais foram novamente inoculados com 0,5 mg dos epitopos preditos, mas dessa vez emulsificados em 100 µL de adjuvante de Freund incompleto (Sigma-Aldrich Chemical Co., EUA). Na última semana antes da infecção experimental, a mesma massa de peptídeos hipotéticos foi inoculada, tendo sido ressuspensa em PBS. Grupos de animais controle dos ensaios incluíam um grupo inoculado da mesma forma, contudo com PBS substituindo a solução de epitopos preditos e um

grupo infectado sem qualquer tipo de inoculação prévia. O desenvolvimento das lesões foi acompanhado como descrito no item 2 dessa seção.

7. Avaliação da blastogênese em culturas de células de linfonodo de camundongos

Os ensaios para verificar a atividade blastogênica dos epitopos preditos foram realizados com células isoladas de linfonodos poplíteos drenantes das lesões de camundongos BALB/c e CBA infectados por *L. (L.) amazonensis*. Os linfonodos foram obtidos dos animais quando a lesão apresentava uma área de aproximadamente 4 mm² (10^a semana para camundongos Bal/C e 14^a semana para camundongos CBA).

Para a obtenção dos linfonodos, os animais foram mortos em câmara de CO₂, sendo então os linfonodos coletados, imediatamente imersos em meio RPMI (LGC do Brasil) gelado suplementado com 2000 UI/ml de penicilina G (Sigma-Aldrich Chemical Co., EUA) e preservados em banho de gelo. Os linfonodos foram então lavados 3x com RPMI gelado suplementado com 200 UI/ml de penicilina G e macerados.

O material insolúvel foi decantado em banho de gelo por 10 min e, então, o sobrenadante foi centrifugado 3x a 500 xg por 10 min a 4 °C para a obtenção das células de linfonodo. A concentração de células em suspensão foi determinada com o uso de câmara de Neubauer e ajustada para a concentração de uso em meio RPMI suplementado com 200 UI/ml de penicilina G e 2% de SFB (Gibco, Invitrogen, Brasil).

As células foram então semeadas (200 µL - 2,5 x 10⁶ céls/ml) em poços de placas de cultura de 96-poços (BD Biosciences, EUA) e coincubadas com os controles ou os epitopos preditos na concentração de 30 µg/mL por 3 dias a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

O controle basal de proliferação celular foi realizado incubando-se as células apenas com meio RPMI suplementado com 0,05% de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich Chemical Co., EUA), 200 UI/ml de penicilina G e 2% de SFB (Gibco, Invitrogen, Brasil). Como controle positivo de blastogênese foi utilizado a lectina concanavalina A (Con A), amplamente conhecida por sua atividade mitogênica sobre linfócitos (Toyoshima et al., 1976), na concentração de 2 µg/mL.

O antígeno particulado de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (APP) na concentração de 30 µg/mL foi utilizado como controle de proliferação específica induzida por fatores de *Leishmania*. Para a obtenção do APP, cerca de 10⁹

promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em fase logarítmica de proliferação foram lavados três vezes por centrifugação (25 °C, 15 min, 8.000 ×g) em PBS. Os parasitos então foram suspensos em 2 mL de PBS e submetidos a uma sequência de ciclos de congelamento/descongelamento (-70 °C/37 °C). O rompimento dos parasitos foi confirmado por microscopia de luz (Microscópio Binocular Nikon Eclipse E200). O APP foi obtido do sobrenadante após uma etapa de centrifugação (10.000 × g, 60 min, 4 °C) e mantido a -70 °C até o momento do uso.

A concentração de proteínas do APP foi determinada de acordo com o método descrito por Lowry et al. (1951), usando albumina de soro bovino (BSA - *Bovine Serum Albumin*) como padrão. A determinação da absorbância foi realizada em cubeta de quartzo em um espectrofotômetro Ultrospec 1100 pro (Amersham Biosciences, GE Healthcare, EUA) no comprimento de onda de 617 nm.

Nas últimas 16h de incubação, o equivalente a 0,1 µCi do nucleosídeo timidina contendo o isótopo radioativo de hidrogênio trítio [³H] foi adicionado a cada poço, para permitir a marcação por incorporação de radioisótopos das células em proliferação.

Ao fim desse período, as células foram recolhidas em papel de filtro, pelo uso de um coletor de células (Skatron Titertek Cell Harvester - Skatron AS, Noruega) e a intensidade de proliferação celular estimulada foi definida como equivalente à intensidade da atividade radioativa da cultura (em contagens por minuto – cpm).

Para se avaliar essa atividade, os papéis de filtro contendo as células das culturas, após secos em estufa a 37 °C, foram imersos em líquido de cintilação (tolueno contendo 0,005% POPOP e 0,5% PPO) e a avaliação da intensidade de radioatividade foi realizada em um contador de beta cintilação (1600 CA Tri-Carb – Packard Instrument Company, EUA).

8. Análise fenotípica das culturas de linfócitos de linfonodo de camundongos

O fenótipo predominantemente induzido nos linfócitos em culturas de células de camundongos incubadas com os epitopos preditos foi avaliado por citometria de fluxo.

As células de linfonodos dos camundongos foram obtidas como descrito no item 7 e incubadas nas mesmas condições dos ensaios de avaliação da blastogênese com os controles e os epitopos preditos, com a distinção de que o volume das culturas nos poços foi diferente (1 mL) e estas foram cultivadas em poços de placas de cultura de 24-poços (Nunc, Thermo Fisher, Scientific, EUA).

Decorrido o tempo de cultivo, as células foram lavadas centrifugação (500 xg, 10 min, 4 °C) em PBS e ressuspensas em PBS contendo 0,05% de azida sódica e 2% de SFB. As células eram então incubadas com anticorpos monoclonais específico conjugados a fluoróforos (IgG de rato anti-CD4 de camundongo/PE-Cy5 e IgG de rato anti-CD8a de camundongo/PE; BD Biosciences, EUA) diluídos a 1:100 em local escuro por 20 min a 4 °C.

Por fim, as células eram novamente lavadas por 2x por centrifugação em PBS nas mesmas condições anteriores e ressuspensas em PBS contendo 1% de paraformaldeído (Sigma-Aldrich Chemical Co.,EUA). A marcação fluorescente das células foi avaliada pelo uso de um citômetro de fluxo EPICS Altra (Beckman Coulter Electronics, EUA) em conjunto com o *software* Cytomation Summit.

Em cada experimento, todas as amostras foram analisadas em triplicata.

9. Avaliação da expressão de citocinas e óxido nítrico por células de linfonodo de camundongos

Os níveis da expressão de citocinas induzida pelos epitopos preditos em células de linfonodo de camundongo em cultura foram avaliados por ensaios com o sobrenadante obtido de culturas utilizadas nos experimentos de análise fenotípica. Nesses ensaios, utilizamos *kits* comerciais da linha *Quantikine Colorimetric Sandwich ELISA (enzyme linked immunosorbant assay - R&D systems, EUA)* para a dosagem de: IL-4, IL-10, IL-12p70 e IFN- γ , conforme as instruções do fabricante.

Resumidamente, os poços das placas de 96-poços previamente recobertos com anticorpos específicos contra cada citocina estudada foram preenchidos com 50 μ L do reagente de diluição de cada *kit*, sendo então adicionados 50 μ L das soluções controle ou padrões de cada *kit* ou ainda das amostras de sobrenadantes de cultura (cada controle ou amostra era analisada em duplicata em cada experimento). Após homogenização, as placas foram incubadas por 2h à temperatura ambiente.

Seguiu-se o descarte da fase líquida presente nos poços, lavagem com os tampões de lavagem fornecidos, por 5x, e a posterior adição de 100 μ L das soluções de anticorpos específicos contra cada citocina, conjugados à enzima peroxidase. As placas foram submetidas a procedimentos de incubação e lavagem como previamente descritos e adição de 100 μ L das soluções-substratos aos poços, seguindo incubação por 30 min à temperatura ambiente em local escuro. Por fim, adicionou-se-se 100 μ L de solução de parada a cada poço e a absorbância dos mesmos (equivalente à concentração de citocinas) foi medida em um leitor de ELISA

Emax (Molecular Devices Inc., EUA) a 450nm, com correção de comprimento de onda a 570nm.

Para a estimativa de produção de óxido nítrico, utilizou-se a dosagem da concentração de nitrito (NO_2) pela metodologia com o reagente de Griess (Green et al., 1982). Utilizando-se placas de 96-poços, alíquotas de 100 μL dos sobrenadantes de cultura foram misturados a 100 μL de reagente de Griess [1 % sulfanilamida (Merck, Brasil) e 0,1 % de N-(1-naftil) dihidrocloro de etilenodiamina (Merck, Brasil) dissolvidos em 2,5 % de ácido fosfórico, (v/v)] e incubadas por 10 min à temperatura ambiente. Em paralelo uma curva-padrão para a determinação da concentração dos nitritos (em μM) foi produzida utilizando-se nitrito de sódio (NaNO_2) diluído em meio RPMI.

A determinação da absorbância (equivalente à concentração de NO) foi realizada em um leitor de ELISA Emax (Molecular Devices Inc., EUA) a 540nm.

10. Análise estatística dos dados

Para o tratamento estatístico dos resultados dos ensaios *in vitro* e *in vivo* foi aplicado o teste-t de *Student* não-pareado bicaudal. Considerou-se que os dados apresentavam diferença estatística significativa quando o valor de p retornado era menor ou igual a 0,05.

11. Ensaios de interação molecular dos complexos H-2/epitopos *in silico* (Molecular Docking)

Para os ensaios de *molecular docking*, utilizamos nas simulações de interação as mesmas moléculas de H-2 classe I as quais havíamos anteriormente utilizado nas análises com os algoritmos *online*: H-2K^d (camundongos BALB/c) e H-2K^k (camundongos CBA).

Os dados estruturais dessas moléculas foram obtidos no banco de dados *Protein DataBank* (PDB) a partir de arquivos de cristalografia dessas moléculas de MHC ligadas a epitopos. Dessa forma, a molécula de H-2K^d encontra-se co-cristalizada com um peptídeo sintético de sequência SYVNTNMGL (arquivo PDB código: 1vgk), enquanto a molécula de H-2K^k encontra-se co-cristalizada com um epitopo de vírus influenza de sequência FEANGNLI (arquivo PDB código: 1zt1).

Para a parte inicial dos ensaios de interação *in silico*, os epitopos originalmente co-cristalizados na fenda das moléculas de H-2 foram alterados em arquivos distintos, utilizando-se o *software Swiss-PDB viewer*, para apresentarem as

sequências dos epitopos que foram selecionados na seção anterior de nosso estudo, mas a posição tridimensional dos átomos da cadeia principal de cada sequência de aminoácidos foi preservada.

Os arquivos contendo os novos complexos MHC/epitopos foram então preparados para os ensaios de *molecular docking* da seguinte forma: o *software GROMOS 96 Force Field* foi utilizado para minimizar a energia dos complexos e corrigir as distorções geométricas das cadeias causadas pela etapa de alteração dos epitopos (trazendo os complexos a uma configuração tridimensional mais estável); os estados de protonação e a carga atômica parcial dos complexos foram definidos utilizando-se esse mesmo *software*; e, finalmente, os epitopos foram ajustados para um estado semi-flexível (permitindo apenas a modificação dos ângulos rotacional, translacional e conformacional) pelo uso do *software AutoTors*.

Durante a preparação dos arquivos para os ensaios, todas as moléculas de água presentes na fenda das moléculas de H-2 na cristalografia foram descartadas, à exceção de três moléculas altamente conservadas, cuja importância na interação com os epitopos já foi reportada (Ogata & Wodak, 2002).

Os dados das moléculas de H-2 cristalizadas foram então separados dos dados dos epitopos e armazenados em arquivos distintos, contendo também os dados de força atômica dessas moléculas (gerados pelo *software GROMOS 96 Force Field*). Esses arquivos foram submetidos a tratamentos *in silico* para formar a estrutura de grade, utilizada pelo *software* que executa os ensaios de *molecular docking* (*AutoDock 3.5*) para definir as interações dos complexos.

Os parâmetros de solvatação de cada átomo das moléculas de H-2 foram definidos pelo uso do *software Addsol*, considerando-se o estado de protonação dos aminoácidos em pH 4.0 (estado zwitteriônico), devido ao pH ácido das vesículas onde ocorrem as interações MHC/epitopos (Harding, 1991). Com base nessas definições, o *software AutoDock 3.5* foi utilizado para definir os valores do potencial eletrostático de Lenard-Jones, que foram empregados para determinar os pontos constituintes das grades tridimensionais para os ensaios de *Molecular Docking*, que por sua vez foram desenhadas para incluir toda a região da fenda das moléculas de H-2.

As grades tridimensionais foram montadas pelo uso do *software AutoGrid 3.0*. O padrão de espalhamento dos pontos para a construção da grade foi definido assumindo-se uma distância entre cada ponto de 0.375 Å. A região central de cada

grade foi definida utilizando-se como referência o átomo central da cadeia principal dos epitopos originalmente co-cristalizados com as moléculas de H-2.

Os ensaios de *molecular docking* propriamente ditos foram então executados pelo *software AutoDock 3.5*. Para cada epitopo hipotético selecionado previamente foram executadas oito simulações de interação com uma molécula de H-2 específica, cada uma delas gerando 256 possíveis soluções (modelos) de interação, o que soma um total de 2048 modelos para cada complexo. Esses modelos foram organizados em famílias, utilizando como critério uma diferença máxima de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) de 3.5 Å.

O modelo que apresentava os valores mais baixos de energias de *docking* e intermolecular em cada família gerada foi selecionado para as análises de valor de energia intermolecular e número de pontes de hidrogênio e de contatos de Van der Waals. Somente os modelos representativos das 5 primeiras famílias (organizadas por valor crescente de energia intermolecular) foram utilizados nas análises de interações, a fim de se manter os valores de energias de *docking* e intermolecular em níveis aceitáveis (abaixo de -8,0 kcal/mol).

Para a análise de interações, os modelos representativos selecionados foram avaliados concomitantemente com modelos estruturais da fenda da molécula de H-2 correspondente, permitindo assim a visualização dos átomos envolvidos nessas interações. Somente os átomos presentes nas fendas das moléculas de H-2 que apresentavam capacidade de interação com o epitopo em pelo menos três dos cinco modelos analisados foram considerados relevantes.

12. Extração de RNA total

Para os ensaios de cinética de expressão de fatores ligados à resposta imune no hospedeiro e de fatores enzimáticos em parasitos ao longo da infecção foi realizada a extração de amostras de animais infectados em diferentes tempos após o inóculo de parasitos.

Animais das linhagens murinas BALB/c e CBA foram infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e acompanhados conforme previamente descrito. A cada duas semanas, dois animais aleatórios de cada linhagem foram mortos em câmara de CO₂, para a retirada de amostras da região do inóculo e do seu linfonodo poplíteo drenante. Estas amostras foram recolhidas em Trizol (Invitrogen, Life Technologies, EUA) e conservadas a -70 °C até o momento da extração de RNA total.

O procedimento utilizado para a extração do RNA total das amostras seguiu o protocolo do Trizol, conforme as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras foram maceradas enquanto imersas em Trizol e o material insolúvel foi removido por centrifugação (12.000 xg, 10 min, 4 °C).

Os sobrenadantes das amostras foram então misturados com clorofórmio puro (Merck, Brasil) na proporção de 1:5 e incubados por 3 min à temperatura ambiente, sendo então centrifugados (12.000 xg, 15 min, 4 °C) para permitir a separação de fases.

A fase aquosa (superior) foi reservada, misturada com álcool isopropílico (Merck, Brasil) na proporção de 1:1, incubada por 10 min à temperatura ambiente e então centrifugada (12.000 xg, 10 min, 4 °C) para precipitar os *pellets* de RNA. Esses *pellets* foram então lavados com etanol a 75% por centrifugação (7.500 xg, 5 min, 4 °C), secos em capela (10 min) e resuspenso em 50 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC – dietil pirocarbonato; Invitrogen, Life Technologies, EUA) por incubação a 60 °C por 10 min.

As amostras de RNA total foram imediatamente convertidas para cDNA (*complementary deoxyribonucleic acid*), conforme descrito a seguir.

13. Síntese de cDNA a partir das amostras de RNA total

A síntese de cDNA foi realizada por reação de transcriptase reversa (RT – *reverse transcriptase*), utilizando-se o *kit SuperScript III first-strand cDNA synthesis for reverse transcriptase-PCR* (Invitrogen, Life Technologies, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, alíquotas de 20 µL das misturas de RT [constituídas por 2,5 ng/µL de iniciadores hexaméricos aleatórios, 0,5 mM de solução de dextrorribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), tampão de RT a 1x, 5mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 0.01 M de ditioneitol (DTT), 2 U/µL da enzima *RNAse OUT*, 10 U/µL da enzima *SuperScript II RT* e 8 µL de amostra de RNA total em água tratada com DEPC] foram incubadas na seguinte sequência: 25 °C por 10 min, 50 °C por 50 min, 85 °C por 5 min e, enfim, resfriadas em banho de gelo. Adicionou-se então 2 U da enzima *RNAse H* a cada alíquota, que foram incubadas a 37 °C por 20 min e, então, armazenadas a -20 °C até uso nos ensaios de PCR.

14. Seleção das sequências de nucleotídeos de interesse

Para a realização dos ensaios de análise dos níveis de expressão de fatores do parasito e do hospedeiro por PCR em tempo real, foi necessário definir as sequências dos genes de interesse e dos genes de controle endógeno para se proceder o desenho do par de iniciadores oligonucleotídicos.

Para os controles endógenos foram eleitos genes *housekeeping* com base na literatura: α -tubulina para as amostras de *Leishmania* (Carter et al., 2006) e β -actina para amostras de camundongo (Overbergh et al., 1999).

Os iniciadores para α -tubulina de *Leishmania* foram desenhados usando como base uma região consenso de sequências de diversas espécies de *Leishmania* anotadas no banco de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>), códigos: XM_001563114.1, XM_001563113.1, XM_001566562.1, AY702009.1, 163 XM_001464016.1 e XM_001681731). Já os iniciadores para β -actina foram desenhados a partir de uma região de divergência entre as sequências de mRNA de β -actina de *Mus musculus* e *Homo sapiens* (códigos do *Genbank*: BC138614.1 e NM_001101.3, respectivamente), a fim de se evitar falsos resultados por contaminação com material humano durante os ensaios de PCR, devido ao alto grau de conservação dessas sequências.

Todas as análises de sequências consensos ou regiões de divergência foram realizadas utilizando-se o algoritmo de alinhamento de sequências *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) com todos os parâmetros ajustados na forma padrão.

Para o desenho de iniciadores para a CPB de *Leishmania*, foi definida uma sequência consenso a partir de quatro sequências de genes de CPB de *L. (L.) mexicana* (códigos do *GenBank*: AJ319727.1, Z49963.2, Z49962.2 e Y09958.1) e de uma sequência de mRNA de CPB de *L. (L.) mexicana* (código do *GenBank*: M97695.1). Já os iniciadores para CPC de *Leishmania* foram desenhados a partir de uma sequência de gene de CPC de *L. (L.) mexicana* (código do *GenBank*: Z48599.1).

Também foram desenhados iniciadores para moléculas de MHC classe I e II de camundongo. Os iniciadores para MHC classe I foram desenhados a partir de uma sequência consenso derivada de genes de dois tipos de H-2: H-2K (códigos do *GenBank*: M18525.1 e M11975.1) e H-2D (códigos do *GenBank*: M18524.1 and L29190.1 e GeneID 14964). Para o desenho dos iniciadores para MHC classe II, foi

utilizada uma sequência consenso derivada da cadeia- α de genes de H-2 tipos E e A (códigos do *GenBank*: GeneID 14968 e GeneID 14960, respectivamente).

15. Desenho e obtenção dos iniciadores para os ensaios de PCR

Todos os iniciadores utilizados no presente estudo foram desenhados utilizando-se o *software online Primer3* v. 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), com todos os parâmetros no ajuste padrão, à exceção de *Product Size Ranges*, o qual foi ajustado para 80-120 pares de bases (pb). Os iniciadores desenhados foram então sintetizados pela empresa Invitrogen Brasil, numa escala de síntese de 50 nM e purificados por dessalinização.

16. Ensaios de PCR convencional

Ensaios de PCR convencional foram realizados para o controle da qualidade das amostras de cDNA e da efetividade dos iniciadores desenhados. Para a realização desses ensaios foram compostas misturas de PCR (45 μ L) constituídas por: tampão para PCR *Platinum Taq* (Invitrogen, Life Technologies, EUA) a 1x, 4 mM de $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich Chemical Co., EUA), 0,2 mM de solução de dNTPs (Invitrogen, Life Technologies, EUA), 4 ng/ μ L do par de iniciadores e 0,025 UI/ μ L da enzima *Platinum Taq DNA polymerase* (Invitrogen, Life Technologies, EUA) em água tratada com DEPC.

A estas misturas foram adicionados 5 μ L de cada amostra de cDNA (diluídas 1:50 em água tratada com DEPC) no momento dos ensaios de PCR. As amostras foram ensaiadas em duplicata em cada experimento.

Amostras de cDNA de promastigostas de *L. (L.) amazonensis* em fase logarítmica de crescimento foram utilizadas como controle para os iniciadores específicos para alvos de *Leishmania*, enquanto amostras de cDNA de camundongos BALB/c e CBA saudáveis foram utilizados como controle para alvos de camundongo.

As condições estabelecidas para os ensaios de PCR foram: etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 3 min (1 ciclo); 40 ciclos de desnaturação (95 °C por 20 seg), hibridização (56 °C por 30 seg) e extensão (72 °C por 30 seg); e, uma etapa final de extensão a 72 °C por 5 min. Os ensaios de PCR foram realizados utilizando-se um termociclador Mastercycler (Eppendorf International, EUA).

Após as PCR, os produtos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado por brometo de etídeo e, então, fotografados utilizando-se o sistema de fotodocumentação *EasyDoc 100* (Bioagency Biotecnologia, Brasil).

Os produtos dos ensaios de PCR foram posteriormente purificados pelo uso do *kit Wizard SV Gels and PCR Clean-UP System* (Promega Corporation, EUA). Resumidamente, a solução contendo os produtos da PCR foi misturada com solução de ligação à membrana (1:1) e incubada dentro das mini-colunas SV por 1 min à temperatura ambiente.

As colunas foram então lavadas 2x por centrifugação (10.000 xg, 5 min, 20 °C) com solução de lavagem de membrana (adicionada de etanol), secadas por centrifugação nas mesmas condições e, então, os produtos foram resuspenso em 50 µL de água tratada com DEPC por centrifugação (10.000 xg, 1 min, 20 °C).

As sequências dos produtos da PCR purificados foram obtidas e analisadas como descrito anteriormente (através da Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/Fiocruz).

Estas sequências foram aplicadas na ferramenta de BLAST do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizando os seguintes parâmetros: BLAST de nucleotídeos através do algoritmo BLASTn, para confirmar a identidade dos produtos amplificados. Os bancos de dados utilizados nestas análises foram: *mouse genomic+transcript* e *Leishmania* (números de *taxid*: 5658 e 38568).

17. Ensaios de PCR em tempo real

Os ensaios de PCR em tempo real foram realizados em um termociclador 7500 *Fast Real Time PCR System* e analisados pelo uso do *software* SDS 7500 v. 2.0 (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA).

Para a realização desses ensaios foram compostas misturas de PCR em tempo real (10 µL) constituídas de *mix Power Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) a 1x e 0.1 µM do par de iniciadores em água tratada com DEPC. A estas misturas foram adicionados 2,5 µL das amostras de cDNA (diluídas 1:50 em água tratada com DEPC) no início dos ensaios de PCR. As amostras foram ensaiadas em duplicata em cada experimento.

As condições de termociclagem utilizadas nos ensaios de PCR em tempo real foram as condições padrão do *software* SDS 7500, com exceção dos ciclos de amplificação, nos quais as condições utilizadas foram similares àquelas dos ensaios de PCR convencional.

Ao final de cada ensaio, foi executada uma etapa de construção de curva de dissociação dos produtos (*continuous melting curve*), a fim de se verificar a especificidade da amplificação no ensaio. Durante os ciclos de amplificação, os dados de fluorescência foram coletados durante a etapa de extensão (72 °C).

A eficiência dos ensaios de PCR em tempo real, para cada combinação de fonte de amostras acrescida de par de iniciadores, foi determinada pela análise de curvas de diluição seriada (1:2) das amostras de cDNA, variando de 1:2 até 1:64. Amostras de cDNA de lesões de camundongos, BALB/c ou CBA, na 20ª semana após a infecção com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, foram utilizadas para as curvas de amplificação dos iniciadores de *Leishmania*, enquanto amostras de cDNA da região do coxim plantar de camundongos saudáveis de ambas as linhagens foram utilizadas para as curvas de amplificação dos iniciadores de MHC de camundongo.

O valor do ciclo de limiar da fluorescência (C_t - *threshold cycle*) foi obtido e aplicado em um gráfico de semi-log (escala log 10) para o cálculo dos valores de coeficiente angular (slope) e de determinação (R^2). Somente experimentos cujas linhas de tendência apresentavam $R^2 \geq 0,98$ foram utilizados nas análises de eficiência.

Para o cálculo da eficiência da amplificação (E), a seguinte fórmula foi utilizada:

$$E = -1 + 10^{(-1/\text{slope})}$$

Os valores de eficiência calculados foram utilizados para ajustar os valores de C_t das amostras analisadas nos ensaios de cinética de expressão ao longo da infecção pela seguinte fórmula:

$$C_{t_{E=100\%}} = C_{t_{E=X\%}} \times [\log(1 + E) / \log 2]$$

18. Determinação da expressão relativa de genes

O método do C_t comparativo ($\Delta\Delta C_t$) foi utilizado para determinar os níveis de expressão dos genes de interesse. O calibrador utilizado para a análise da expressão dos genes de *Leishmania* foram amostras de cDNA de promastigotas na fase logarítmica da proliferação, já para os genes de camundongo foram utilizadas amostras de tecido do coxim plantar e de linfonodos poplíteos extraídos de animais das duas cepas estudadas (BALB/c e CBA).

As amostras para estes ensaios foram extraídas de dois sítios distintos: o coxim plantar (área da inoculação/lesão) e seu linfonodo poplíteo drenante. Essas amostras foram obtidas de animais em tempos consecutivos após a infecção (de 2 em 2 semanas), da 2^a até a 16^a semana para ambas as linhagens murinas. Complementarmente, amostras de animais na 18^a e 20^a semanas pós-infecção foram colhidas, apenas para a linhagem CBA, devido à progressão mais lenta da lesão nessa linhagem

Conforme citado anteriormente, os controles endógenos utilizados para genes de *Leishmania* e de camundongos, respectivamente, foram genes de α -tubulina e β -actina. Os valores de quantidade relativa ou níveis de expressão normalizados (RQ) foram calculados com o auxílio do *software SDS 7500*, aplicando-se a seguinte fórmula:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

RESULTADOS

1. Definição das sequências de nucleotídeos e aminoácidos da extensão COOH-terminal de cisteína-proteinase B de *L. (L.) amazonensis*

Conforme descrito na metodologia a sequência de nucleotídeos da extensão COOH-terminal de CPB de *L. (L.) amazonensis* foi definida utilizando-se iniciadores específicos para a extensão COOH-terminal da CP Lpcys2 de *L. (L.) pifanoi* e, então, convertida para a sequência de aminoácidos (Figura 2). O uso desses iniciadores para esse sequenciamento foi possível pela proximidade evolutiva dessas duas espécies de *Leishmania*, pois ambas pertencem ao complexo *L. (L.) mexicana*.

As sequência de nucleotídeos obtida para a região estudada de *L. (L.) amazonensis* possui 96% de similaridade com a sequência da região equivalente da Lpcys2 de *L. (L.) pifanoi*, conforme analisado pelo software *ClustalW*, indicando um alto grau de conservação dessa região entre essas espécies de um mesmo complexo.

2. Comparações das sequências de aminoácidos de extensões COOH-terminal de CPs de diversas espécies de *Leishmania*

A busca por BLAST no banco de dados UniProtKB usando como parâmetro de pesquisa a sequência de aminoácidos da extensão COOH-terminal da CPB de *L. (L.) amazonensis* teve como resultado oito sequências de extensões COOH-terminal de CPs de espécies de *Leishmania* de diferentes complexos: três pertencentes a espécies do complexo *L. (L.) mexicana*, 3 de espécies do complexo *L. (L.) donovani* e 2 de espécies do complexo *L. (L.) major*.

Especificamente, as sequência de extensões COOH-terminal selecionadas pertencem às CPs: Lpcys2 de *L. (L.) pifanoi* (código do UniProtKB: Q05094), cpb2.8 e cpb18 de *L. (L.) mexicana* (códigos do UniProtKB: P36400 e Q7JMY2), Idccys1 de *L. (L.) chagasi* (código do UniProtKB: 018698), CPB1 de *L. (L.) infantum* (código do UniProtKB: Q7K8Z6), CP de *L. (L.) donovani* (código do UniProtKB: Q95WR7) e 2 CPs de *L. (L.) major* (códigos do UniProtKB: Q4QI61 e Q4QI66).

Estas sequências, juntamente com a sequência da extensão COOH-terminal de CPB de *L. (L.) amazonensis*, foram organizadas em seis grupos devido à ocorrência de níveis de similaridade total entre algumas delas. Os grupos foram formados e

5' - gcacccagacccgtgatgggtggagcaggtgatctgcttcgataagaactgcactcaggggtgcaagaaaaccctgatcaaggcgaacgagtgc

Nt- A P R P V M V E Q V I V F D K N C T Q G C K K T L I K A N E C

cacaagaacgggggaggaggcgcctctatgatcaagtgcagtcgagcagcggtgacgatgtgcacgtactcgaacgaattctgcctgggcggggggctg

H K N G G G A S M I K C S P Q T V T M C T Y S N E F C L G G G L

tgctcgagactcctgatggtaagtgcgcgccgtactttttgggctcggtcattaacacctgtcactacacg -3'

C L E T P D G K C A P Y F L G S V I N T C H Y T -Ct

Figura 2 – Sequências de nucleotídeos (em cima) e de aminoácidos (embaixo) da extensão COOH-terminal de CPB de *L. (L.) amazonensis*. As sequências estão transcritas nas ordenações de 5'→3' e NH₃-terminal (Nt) → COOH-terminal (Ct) para nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente. Os aminoácidos (representados pelo código de 1 letra) estão organizados abaixo do primeiro nucleotídeo de sua tríade de nucleotídeos. O tamanho dessa região foi determinado com base na sequência completa reportada da extensão COOH-terminal de Lpcys2 de *L. (L.) pifanoi*.

nomeados da seguinte forma: grupo CT1 (formado pelas sequências da Lpcys2 e da cpb2.8), grupo CT2 (cpb18), grupo CT3 (CPB de *L. (L.) amazonensis*), grupo CT4 (ldccys1 e CPB1), grupo CT5 (CP de *L. (L.) donovani*) e grupo CT6 (CPs de *L. (L.) major*), conforme observado na Figura 3.

Os níveis de similaridades entre esses grupos foram analisados pelo uso da ferramenta de alinhamento *ClustalW*, mostrando uma variação de 36% a 90% de similaridade entre esses grupos (Tabela I). A extensão COOH-terminal da CPB de *L. (L.) amazonensis* (CT3) apresentou até 93% de similaridade para sequências do mesmo complexo e até 68% de similaridade para sequências de outros complexos.

3. Definição de epitopos de H-2 classe I hipotéticos presentes nas sequências das extensões COOH-terminal de CPs de *Leishmania*

As sequências de aminoácidos determinadas para os grupos CT na etapa anterior foram analisadas por algoritmos *online* de predição de clivagem proteassômica (NetChop e PProC) e de epitopos de MHC (SYFPEITHI).

Ao fim do processamento, foram encontrados 4 epitopos preditos na sequência do grupo CT1, 11 epitopos no CT2, 11 epitopos no grupos CT3, 5 epitopos no grupo CT4, 8 epitopos no grupo CT5 e 16 epitopos no grupo CT6, conforme indicado na Tabela II.

Após a definição dos epitopos preditos, estes foram analisados pelo uso da ferramenta *ClustalW*, a fim de se verificar a presença de epitopos preditos de H-2 conservados intra ou inter-complexos.

Epitopos preditos com similaridade de 100% foram observados apenas entre grupos de um mesmo complexo de *Leishmania*. Dentro do complexo *L. (L.) mexicana*, apenas um epitopo é comum aos três grupos CT: KNGGGGASMI, enquanto o epitopo CTYSNEFCV é comum aos grupos CT1 e CT2. No complexo *L. (L.) donovani*, dois epitopos são comuns aos dois grupos CT: KKSLLTANV e PHCFGPGLCL. Como havia apenas um grupo CT pertencente ao complexo *L. (L.) major*, não foi possível realizar análises intra-complexo.

Nas análises inter-complexos, apenas dois epitopos preditos pertencentes a grupos CT de complexos distintos apresentaram um nível de similaridade maior que 50%: os peptídeos EFCLGGGLCL (pertencente ao grupo CT3) e PHCFGPGLCL (pertencente aos grupos CT4 e CT5), com nível de similaridade de 60%.

CT1: APRPVMVEQVICFDKNCTQGCRKTLIKANECHKNGGGGASMIKCSPOKVTMCTYSNEFCVGGGLCFETPDGKCAPYFLGSIMNTCHYT
 CT2: APRPVVVEQVICFDKNCRRGCRKTLIKVNECRKNGGGGASMIKCSPOKVTMCTYSNEFCVGGGLCFETHDGKCSFYFFGSIMNTCHYT
 CT3: APRPVMVEQVICFDKNCTQGCKKTLIKANECHKNGGGGASMIKCSPOQVTMCTYSNEFCLGGGLCLETPDGKCAPYFLGSVINTCHYT
 CT4: APKRVTVEQMMCTDMYCREGCKKSLLTANVCYKNGGGGSSMTKCGPQKVLMSYSNPHCFGPGLCLETPDGKCAPYFLGSIMNTCQYT
 CT5: APKRVTVEQVMCTDMYCREGCKKSLLTANVCYKNGGGGSSMTKCGPKKVLMSYSNPHCFGPGLCLETPDGKCAPYFLGSIMNTCQYT
 CT6: APKRVTVKQITCTDYFCRKGCKTTVIPTKECLPNGAGGSFQMECGDHQVLKLTYSMNCTGEAKYTVTREGKCGISWSGSSKSIQYV

Figura 3 – Sequências completas das extensões COOH-terminal dos grupos definidos por similaridade para cisteína-proteases de diferentes espécies de *Leishmania*: grupo CT1 (Lpcys2 e cpb2.8), grupo CT2 (cpb18), grupo CT3 (CPB de *L. (L.) amazonensis*), grupo CT4 (ldccys1 e CPB1), grupo CT5 (CP de *L. (L.) donovani*) e grupo CT6 (CPs de *L. (L.) major*). Cada sequência completa apresenta 88 aminoácidos. As caixas pontilhadas destacam as regiões com diferenças entre as sequências.

Tabela I – Níveis de similaridade (em porcentagem) retornado pelo uso da ferramenta de alinhamento *ClustalW* para os diferentes grupos de extensões COOH-terminal de CPs de *Leishmania*

Grupos comparados			Similaridade (em %)
CT1	X	CT2	90%
CT1	X	CT3	93%
CT1	X	CT4	69%
CT1	X	CT5	69%
CT1	X	CT6	36%
CT2	X	CT3	84%
CT2	X	CT4	65%
CT2	X	CT5	65%
CT2	X	CT6	37%
CT3	X	CT4	68%
CT3	X	CT5	68%
CT3	X	CT6	37%
CT4	X	CT5	97%
CT4	X	CT6	43%
CT5	x	CT6	43%

Grupos CT formados por sequências idênticas de extensões COOH-terminal de *Leishmania*: grupo CT1 (Lpcys2 e cpb2.8), grupo CT2 (cpb18), grupo CT3 (CPB de *L. (L.) amazonensis*), grupo CT4 (ldccys1 e CPB1), grupo CT5 (CP de *L. (L.) donovani*) e grupo CT6 (CPs de *L. (L.) major*).

Tabela II– Epitopos preditos de MHC classe I nas sequências dos grupos CT

Grupo	Sequência de aas	Número de aas	Haplotipo de H-2K	Escore
CT1	KNGGGGASMI	10	H-2K ^d	13
	NGGGGASMI	9	H-2k ^d / H-2K ^k	15 / 13
	GGGGASMI	8	H-2K ^k	13
	CTYSNEFCV	9	H-2K ^d	10
CT2	PRPVVVEQVI	10	H-2K ^d	11
	RPVVVEQVI	9	H-2K ^d / H-2K ^k	17 / 11
	PVVVEQVI	8	H-2K ^k	11
	PRPVVVEQV	9	H-2K ^d / H-2K ^k	13 / 11
	RPVVVEQV	8	H-2K ^k	11
	GCRKTLIKV	9	H-2K ^k	10
	CRKTLIKV	8	H-2K ^k	11
	KNGGGGASMI	10	H-2K ^d	13
	NGGGGASMI	9	H-2k ^d / H-2K ^k	15 / 13
	GGGGASMI	8	H-2K ^k	13
	CTYSNEFCV	9	H-2K ^d	10
CT3	KNGGGGASMI	10	H-2K ^d	13
	NGGGGASMI	9	H-2k ^d / H-2K ^k	15 / 13
	GGGGASMI	8	H-2K ^k	13
	MCTYSNEFCL	10	H-2k ^d	10
	CTYSNEFCL	9	H-2k ^d	12
	EFCLGGGLCL	10	H-2k ^d	16
	FCLGGGLCL	9	H-2k ^d	17
	CLGGGLCL	8	H-2k ^b	10
	CAPYFLGSVI	10	H-2k ^d	11
	APYFLGSVI	9	H-2k ^d / H-2K ^k	13 / 13
	PYFLGSVI	8	H-2K ^k	13
CT4	KKSLLTANV	9	H-2k ^d / H-2K ^k	10 / 10
	KSLLTANV	8	H-2K ^k	12
	PHCFGPGLCL	10	H-2k ^d	10
	HCFGPGLCL	9	H-2k ^d	14
	CFGPGLCL	8	H-2k ^b	10
CT5	KKSLLTANV	9	H-2k ^d / H-2K ^k	10 / 10
	KSLLTANV	8	H-2K ^k	12
	MTKCGPKKVL	10	H-2k ^d	13
	TKCGPKKVL	9	H-2k ^d	18
	KCGPKKVL	8	H-2k ^b	10
	PHCFGPGLCL	10	H-2k ^d	10
	HCFGPGLCL	9	H-2k ^d	14
	CFGPGLCL	8	H-2k ^b	10
CT6	TTVIPTKECL	10	H-2k ^d	15
	TVIPTKECL	9	H-2k ^d	20
	VIPTKECL	8	H-2k ^b	13
	QMECGDHQVL	10	H-2k ^d	11
	MECGDHQVL	9	H-2k ^d / H-2K ^k	13 / 11
	ECGDHQVL	8	H-2k ^b	11
	ECGDHQVLKL	10	H-2k ^d	10
	CGDHQVLKL	9	H-2k ^d	11
	GDHQVLKL	8	H-2k ^b / H-2K ^k	11 / 13
	GEAKYTVTR	9	H-2K ^k	11
	ISWSGSSKSI	10	H-2k ^d	15
	SWSGSSKSI	9	H-2k ^d / H-2K ^k	20 / 15
	WSGSSKSI	8	H-2K ^k	14
	GSSKSICQYV	10	H-2k ^d	10
	SSKSICQYV	9	H-2k ^d	16
SKSICQYV	8	H-2K ^k	10	

Não foram analisados os epitopos preditos já presentes na sequência de outros epitopos preditos maiores. Nesse caso, apenas os epitopos preditos maiores foram analisados, uma vez que os epitopos menores são apenas trechos destes, estando, portanto, necessariamente presentes nos mesmos grupos CT.

A síntese química dos epitopos a serem utilizados nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, foi realizada apenas para os epitopos derivados da extensão COOH-terminal de CPB de *L. (L.) amazonensis* (CT3) preditos de se ligar à fenda de H-2K dos haplotipos d e k. O critério de escolha baseou-se nos haplotipos das linhagens de camundongos que seriam utilizadas nesses ensaios (BALB/c e CBA). Com base nesse critério, 9 epitopos preditos foram selecionados para a síntese química, sendo nomeados e utilizados nos ensaios com linhagens específicas conforme indicado na Tabela III.

Todos os epitopos preditos sintetizados apresentaram-se livres de endotoxinas, conforme testado por *kit* específico (limiar de detecção do *kit*: 0,1 UI/mL).

4. Efeitos da imunização prévia com os epitopos preditos sobre o desenvolvimento das lesões em camundongos submetidos a infecção experimental

Conforme observado na Figura 4, os camundongos BALB/c apresentaram um desenvolvimento mais rápido das lesões, com as mesmas alcançando uma área final de $10,2 \pm 1,2 \text{ mm}^2$ na 16ª semana de infecção, enquanto camundongos CBA apresentaram lesões com tamanho equiparável ($9,6 \pm 6,7 \text{ mm}^2$) somente na 20ª semana de infecção, em ambos os grupos controle utilizados.

Contudo, nenhum dos epitopos preditos testados foi capaz de promover uma alteração estatisticamente significativa tanto no perfil de progressão das lesões ao longo do tempo quanto na área das lesões no último ponto analisado em relação ao grupo controle, nas duas linhagens estudadas.

5. Indução de blastogênese em células de camundongo em cultura pelos epitopos preditos

Células obtidas de linfonodos de camundongos apresentando lesões por *L. (L.) amazonensis* foram incubadas em cultura com os epitopos preditos e a blastogênese foi medida pela incorporação de moléculas marcadas com isótopos radioativos.

Tabela III – Epitopos selecionados com base nos haplotipos dos animais selecionados para os ensaios biológicos para síntese química e utilização nos ensaios *in vivo* e *in vitro*

Nome do epitopo	Sequência de aminácidos	Linhagem testada
P1	KNGGGGASMI	BALB/c
P2	NGGGGASMI	BALB/c e CBA
P3	GGGGASMI	CBA
P4	MCTYSNEFCL	BALB/c
P5	CTYSNEFCL	BALB/c
P6	FCLGGGLCL	BALB/c
P7	CAPYFLGSVI	BALB/c
P8	APYFLGSVI	BALB/c e CBA
P9	PYFLGSVI	CBA

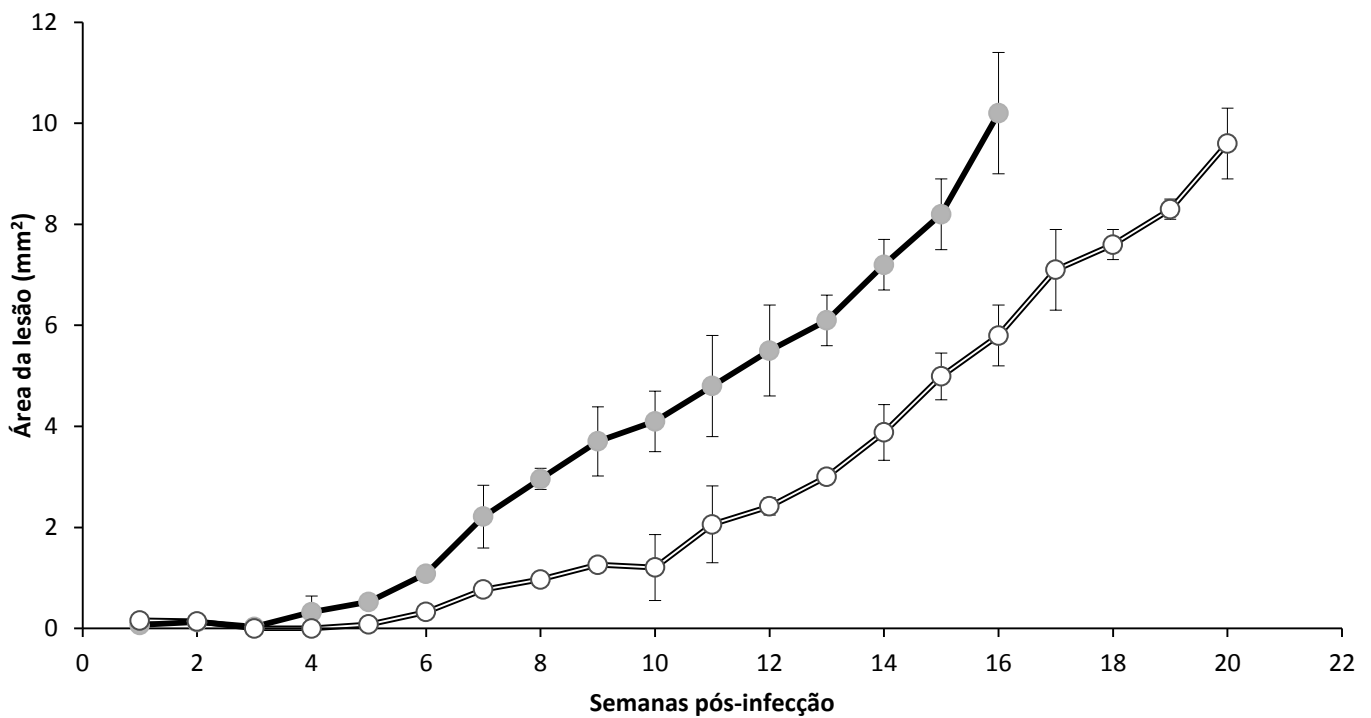


Figura 4 - Acompanhamento do desenvolvimento de lesões em camundongos Bal/C (●) e CBA (○) após infecção experimental com *L. (L.) amazonensis*. Os animais foram inoculados subcutaneamente com $1,0 \times 10^6$ promastigotas em fase logarítmica de crescimento no coxim plantar do membro posterior esquerdo. O desenvolvimento das lesões foi acompanhado pela medida da altura e largura da pata infectada semanalmente com o uso de um paquímetro. Os resultados apresentados estão no formato média \pm desvio-padrão.

Nesses ensaios observou-se que os epitopos P4 e P5 são capazes de induzir à proliferação de células de BALB/c em cultura acarretando um aumento no número de células de 2,2x e 1,7x, respectivamente), como observado na Figura 5A. Já em culturas de células de camundongos CBA infectados, os epitopos P2, P8 e P9 demonstraram a capacidade de induzir blastogênese, com um aumento no número de células de 2x, 1,7x e 2,3x, respectivamente (Figura 5B)

O controle positivo de proliferação por Con A demonstrou eficiência sobre as células de ambas as linhagens testadas, com índices de proliferação de 7,2x e 6,2x com relação ao controle basal, respectivamente. O controle de blastogênese específica por fatores de *Leishmania* utilizando-se APP também aumentou o número de células em cultura em 1,9x e 1,4x, para BALB/c e CBA.

6. Influência dos epitopos preditos sobre os fenótipos CD4+ e CD8+ dos linfócitos de camundongo em cultura

As porcentagens de linfócitos apresentando os fenótipos CD4+ e CD8+ foram analisadas em culturas de células de linfonodo de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* e foram determinadas pelo uso de anticorpos monoclonais específicos contra esses marcadores de superfície, conjugados a fluoróforos, através do uso de um citômetro de fluxo EPICS Altra.

Quando incubadas com os epitopos preditos P5 e P6, as culturas de células de linfonodo de camundongos BALB/c apresentaram uma diminuição na porcentagem de linfócitos CD8+ de 31% e 17%, respectivamente, em relação ao controle basal, como mostrado na Figura 6. O epitopo P8, ao contrário, foi capaz de aumentar a porcentagem de linfócitos CD8+ em 34% em relação ao controle.

Quanto aos linfócitos CD4+, o epitopo P8 apresentou a capacidade de reduzir a porcentagem desse tipo celular quando co-incubado em cultura, com decréscimo de 65% (Figura 7).

Nos ensaios com células de linfonodo de camundongos CBA nenhum dos epitopos testados foi capaz de alterar significativamente as porcentagens de linfócitos CD4+ ou CD8+ em cultura.

Devido ao efeito do epitopo P8 sobre as porcentagens de linfócitos CD4+ e CD8+ de BALB/c em cultura, este foi capaz de induzir a uma alteração significativa da proporção entre esses dois tipos celulares na cultura: enquanto a proporção basal de CD8+/CD4+ nas culturas foi de 0,5, aquelas incubadas com o epitopo P8

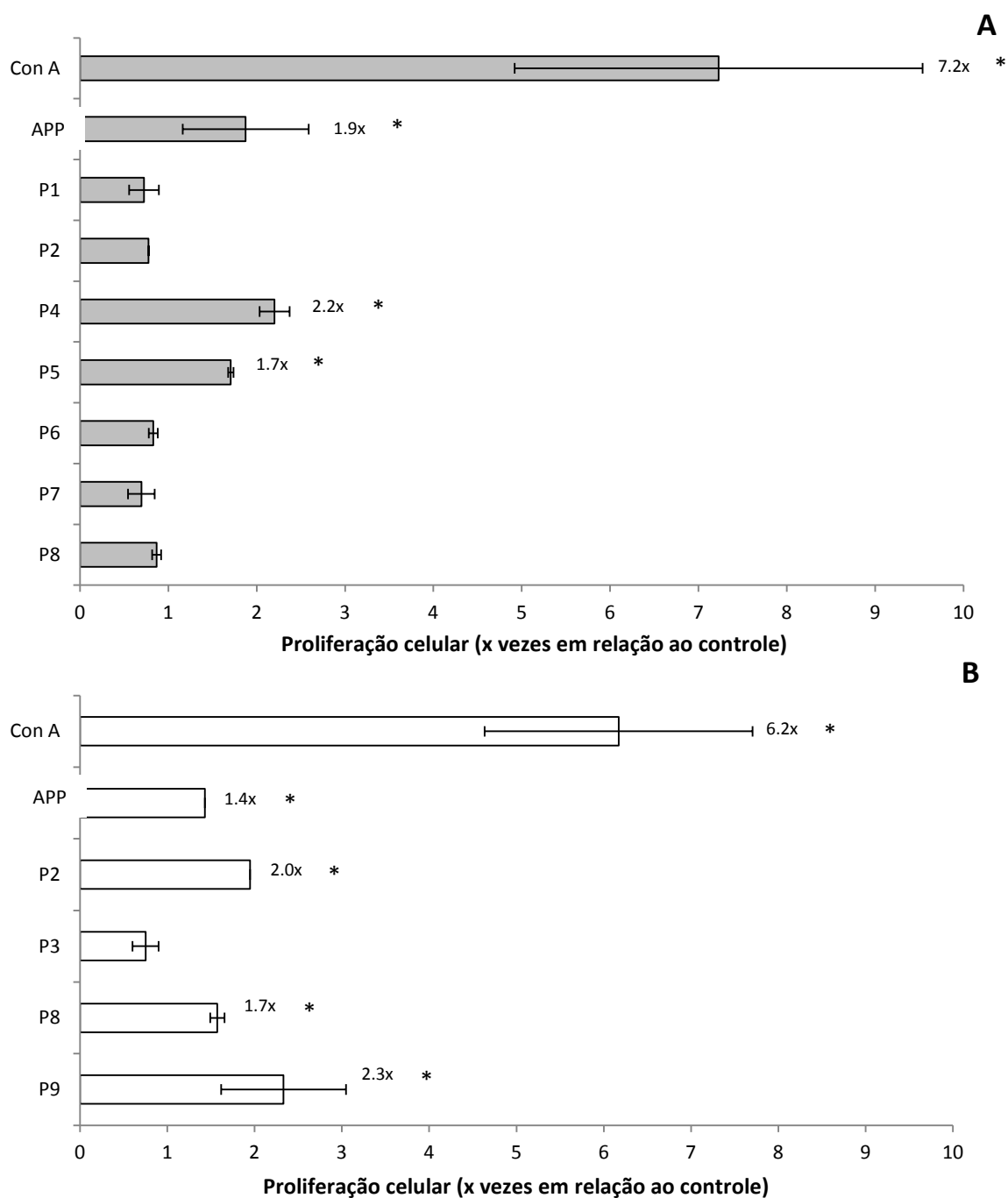


Figura 5 – Blastogênese em culturas de células de linfododos de camundongos induzida pela ação de epítopos preditos derivados da extensão COOH-terminal de CPB de *L. (L.) amazonensis*. As culturas de células de camundongos BALB/c (A) e CBA (B), previamente infectados, foram incubadas em placas de 96-poços, por 3 dias, com epítopos preditos (30 µg/mL), APP (30 µg/mL) ou Con A (2 µg/ml), coincubadas com timidina-[³H] (0.1 µCi/poço) nas últimas 16h em estufa e a radioatividade incorporada (relacionada ao índice de proliferação) foi determinada em contador de beta-cintilação. Os resultados mostrados são representativos de pelo menos três ensaios independentes. **p*<0,05.

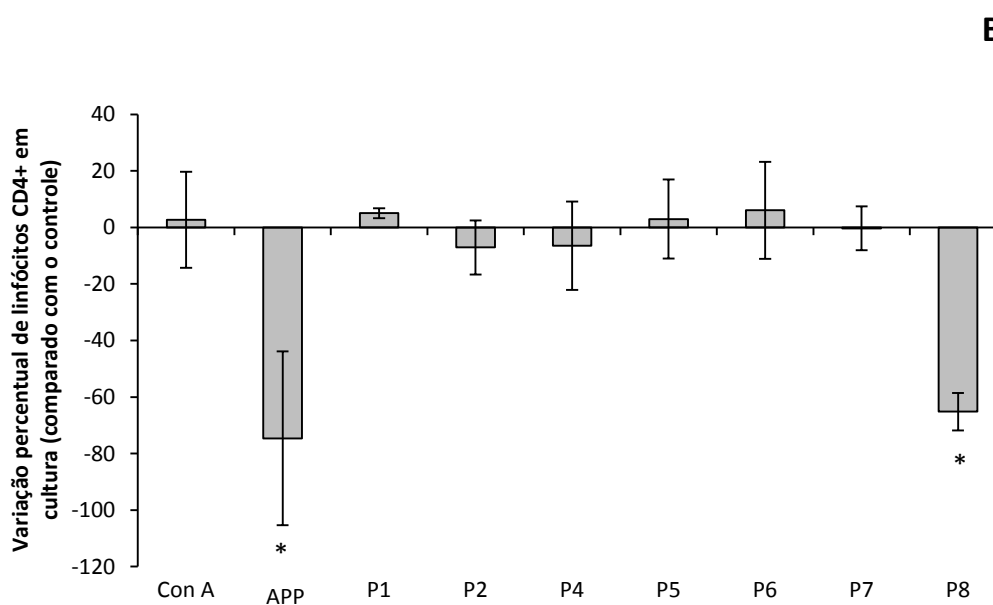
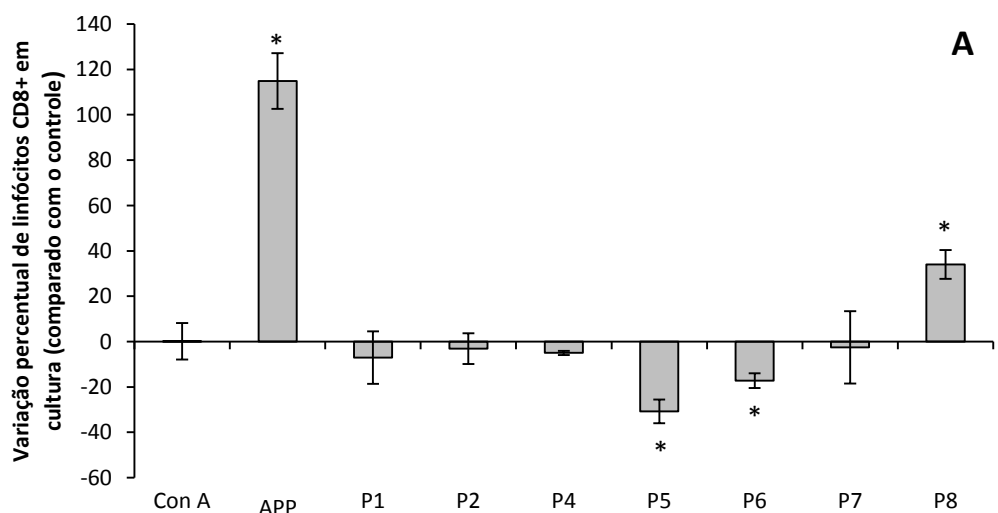


Figura 6 – Porcentagens de linfócitos T CD8+ (A) ou CD4+ (B) em culturas de células de linfonodo de camundongos BALB/c, após incubação com os epitopos preditos derivados da extensão COOH-terminal de CPB de *L. (L.) amazonensis*. As células em cultura foram incubadas por 3 dias em placas de 24-poços com epitopos sintéticos (30 µg/mL), APP (30 µg/mL) ou Con A (2 µg/mL), marcadas com anticorpos específicos contra marcadores CD4 ou CD8 conjugados a fluoróforos e submetidas a análise por citometria de fluxo. Os resultados apresentados são representativos de pelo menos três ensaios independentes. * $p < 0.05$.

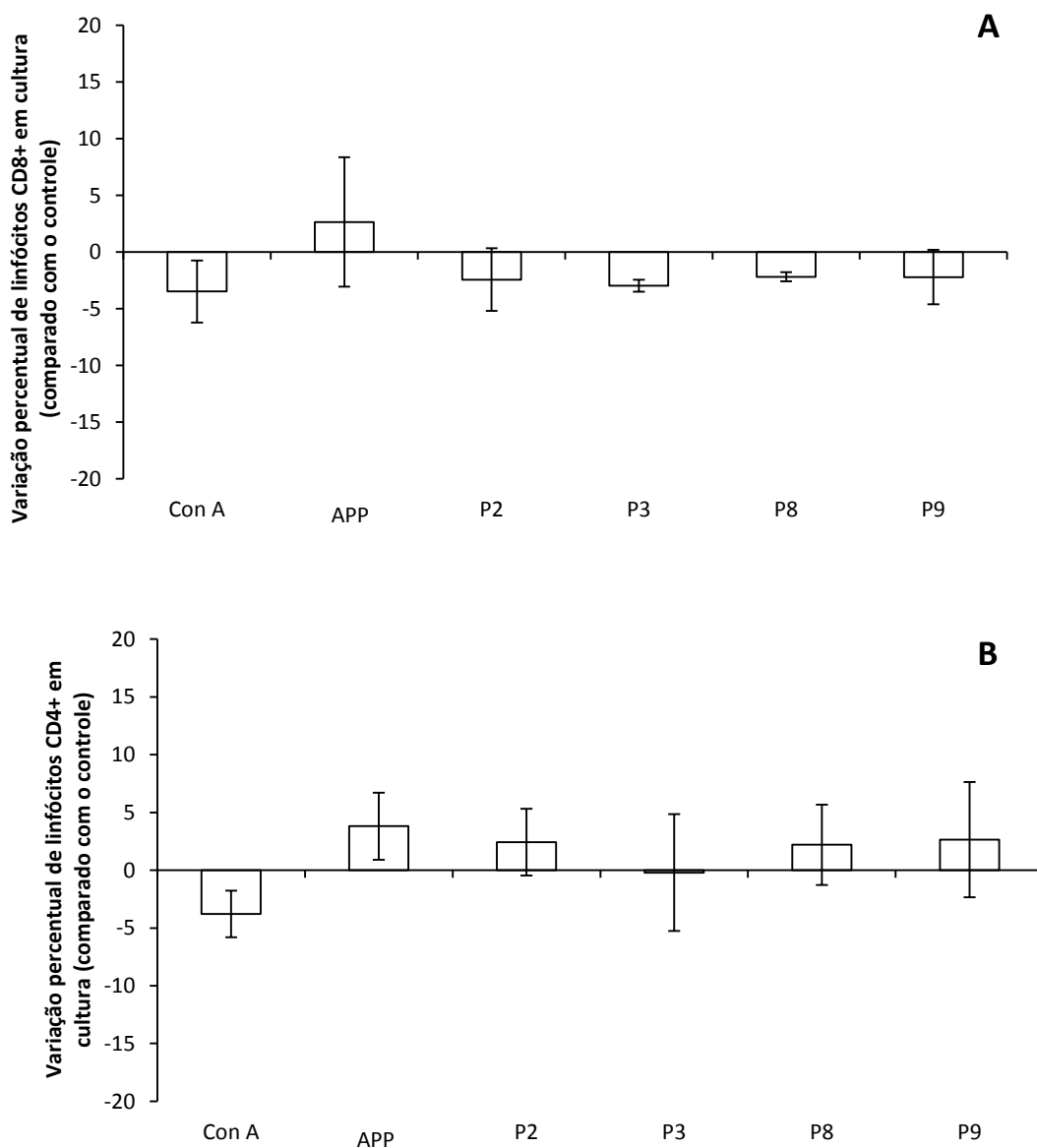


Figura 7 – Porcentagens de linfócitos T CD8+ (A) ou CD4+ (B) em culturas de células de linfonodo de camundongos CBA, após incubação com os epitopos preditos derivados da extensão COOH-terminal de CPB de *L. (L.) amazonensis*. As células em cultura foram incubadas por 3 dias em placas de 24-poços com epitopos sintéticos (30 µg/mL), APP (30 µg/mL) ou Con A (2 µg/mL), marcadas com anticorpos específicos contra marcadores CD4 ou CD8 conjugados a fluoróforos e submetidas a análise por citometria de fluxo. Os resultados apresentados são representativos de pelo menos três ensaios independentes. * $p < 0.05$.

apresentaram um proporção de 1,8, quase quadruplicando a quantidade relativa de linfócitos CD8+ em cultura. Os peptídeos P5 e P6 também alteraram a proporção de CD8+/CD4+ em culturas de células de camundongos BALB/c, mas de forma mais discreta, pois ambos os epitopos apresentaram influência apenas sobre linfócitos CD8+, induzindo a uma proporção CD8+/CD4+ de 0,3 (Figura 6).

A Con A, utilizada como controle positivo de blastogênese, não apresentou alterações significativas nas porcentagens de linfócitos CD4+ ou CD8+ em nenhuma das duas linhagens murinas e, por isso, também não alterou a proporção entre esses tipos celulares. Já o APP apresentou um perfil de ação sobre esses linfócitos de forma similar ao observado para o epitopo P8: observou-se um aumento na porcentagem de linfócitos CD8+, acréscimo de 115%, diminuição na porcentagem de linfócitos CD4+, decréscimo de 75%, e proporção CD8+/CD4+ de 3.5.

7. Produção de citocinas e óxido nítrico por células de camundongo em cultura induzida pelos epitopos preditos

Os níveis de citocinas relacionadas a respostas Th1 e Th2 foram analisados nos sobrenadantes de culturas de células de linfonodo de camundongos previamente infectados, após a incubação com epitopos preditos, por *kits* de ELISA comerciais. Os valores basais de produção de citocinas pelas células em cultura, ou seja, os valores médios obtidos para as culturas controle, foram subtraídos dos valores obtidos para os epitopos preditos ou os controles positivos.

Os perfis de produção de citocinas observados para as células em cultura podem estar relacionados à capacidade das linhagens dos camundongos de controlar a infecção por *Leishmania*. Dessa forma, foram analisadas, em culturas de células de BALB/c (Tabela IV) ou CBA (Tabela V), duas citocinas relacionadas à resposta Th1 (IL-12 e INF- γ) e duas citocinas relacionadas à resposta Th2 (IL-4 e IL-10).

Em culturas de células de camundongos BALB/c, os epitopos P1 e P2 apresentaram a capacidade de promover a expressão de citocinas relacionadas ao perfil da resposta Th1 (IL-12 e IFN- γ , respectivamente), enquanto o epitopo P6 promoveu a expressão de IL-10, relacionada à resposta Th2. Já o peptídeo P4 foi capaz de induzir à expressão de citocinas relacionadas aos dois perfis de resposta Th (IL-10 e IFN- γ). Nessas mesmas culturas, os controles Con A e APP demonstraram a capacidade de induzir à expressão de todas as citocinas testadas.

Tabela IV – Níveis de citocinas no sobrenadante de culturas de células de linfondo de camundongos BALB/c previamente infectados com *L. (L.) amazonensis*, após incubação com epitopos preditos e controles

	pg/mL				µM
	IL-4	IL-10	IL-12	INF-γ	NO
Con A	979,69±3,79	590,30±77,20	32,16±5,21	872,33±17,12	7,78±3,49
APP	37,82±5,67	188,30±34,88	12,02±11,77	474,92±92,24	0,84±0,13
P1	ND	ND	75,00±34,65	ND	ND
P2	ND	ND	ND	15,88±3,19	ND
P4	ND	10,97±2,47	ND	49,25±20,10	ND
P5	ND	ND	ND	ND	ND
P6	ND	2,97±0,82	ND	ND	ND
P7	ND	ND	ND	ND	ND
P8	ND	ND	ND	ND	ND

Os valores médios basais das concentrações de citocinas e NO no sobrenadante das culturas foram subtraídos dos valores obtidos para as amostras e controles positivos. Os resultados apresentados são representativos de pelo menos três ensaios independentes. Os valores na tabela estão no formato: média ±desvio-padrão. ND – abaixo do limiar estabelecido pelo grupo controle.

Tabela V – Níveis de citocinas no sobrenadante de culturas de células de linfondo de camundongos CBA previamente infectados com *L. (L.) amazonensis* após incubação com epítopos preditos e controles

	pg/mL				µM
	IL-4	IL-10	IL-12	INF-γ	NO
Con A	226,84± 9,53	338,10±11,49	26,85±11,94	939,48±0,00	ND
APP	33,67± 4,82	68,57±6,88	ND	87,06±12,23	1,39±0,96
P2	ND	ND	18,37±11,58	ND	ND
P3	ND	ND	16,44±3,25	ND	ND
P8	ND	27,46±0,74	ND	ND	ND
P9	ND	21,03±0,16	8,02±3,85	ND	ND

Os valores médios basais das concentrações de citocinas e NO no sobrenadante das culturas foram subtraídos dos valores obtidos para as amostras e controles positivos. Os resultados apresentados são representativos de pelo menos três ensaios independentes. Os valores na tabela estão no formato: média ±desvio-padrão. ND – abaixo do limiar estabelecido pelo grupo controle.

Nos ensaios com culturas de células de camundongos CBA, os epitopos P2 e P3 induziram à expressão de citocina relacionada à resposta Th1 (IL-12), enquanto o epítipo P8 induziu à expressão de citocina relacionada à resposta Th2 (IL-10).

Assim como em culturas de células de camundongos Balb/c, nas culturas de células de CBA houve um epítipo, o P9 que se mostrou capaz de promover a expressão de citocinas relacionadas aos dois tipos de resposta Th (IL-10 e IL-12). O controle Con A também promoveu a expressão de todas as citocinas testadas, enquanto, distintamente ao observado para BALB/c, o APP não teve esse mesmo efeito, sendo incapaz de promover a expressão de IL-12.

A produção de NO não foi induzida pelos epítipos preditos em nenhuma das duas linhagens testadas. Em culturas de células de BALB/c, tanto a Con A quanto o APP foram capazes de induzir à produção dessa molécula, entretanto, nas culturas de células de CBA, somente o APP teve algum efeito.

8. Análise das energias e tipos de interações dos complexos H-2/epítipos por *Molecular Docking*

Através do uso de modelos virtuais em ensaios de *Molecular Docking in silico* foram realizadas predições dos números de pontes de hidrogênio, contatos de Van der Waals e energias intermoleculares dos complexos formados pela ligação dos epítipos à fenda da molécula de H-2 (Figuras 8, 9 e 10). A análise desses parâmetros é importante na compreensão da forma como essas moléculas interagem e seus padrões de interação podem estar relacionados às características dos efeitos biológicos causados pelos epítipos.

Estes ensaios indicaram a importância de alguns resíduos de aminoácido específicos da fenda das moléculas do MHC na interação com os epítipos, uma vez que foi prevista sua capacidade de formar um grande número de interações por pontes de hidrogênio ou contatos de Van der Waals. Os resíduos foram numerados de acordo com as informações contidas nos arquivos originais das cristalografias das moléculas.

Para moléculas do tipo H-2K^d, estes resíduos são: glutamina 63, arginina 66, triptofano 73, arginina 97, treonina 143, triptofano 147, tirosina 155 e tirosina 159. Alguns aminoácidos também apresentam a capacidade de gerar diversos contatos de Van der Waals com os epítipos, mas não pontes de hidrogênio, sendo estes: fenilalanina 99, tirosina 156 e triptofano 167.

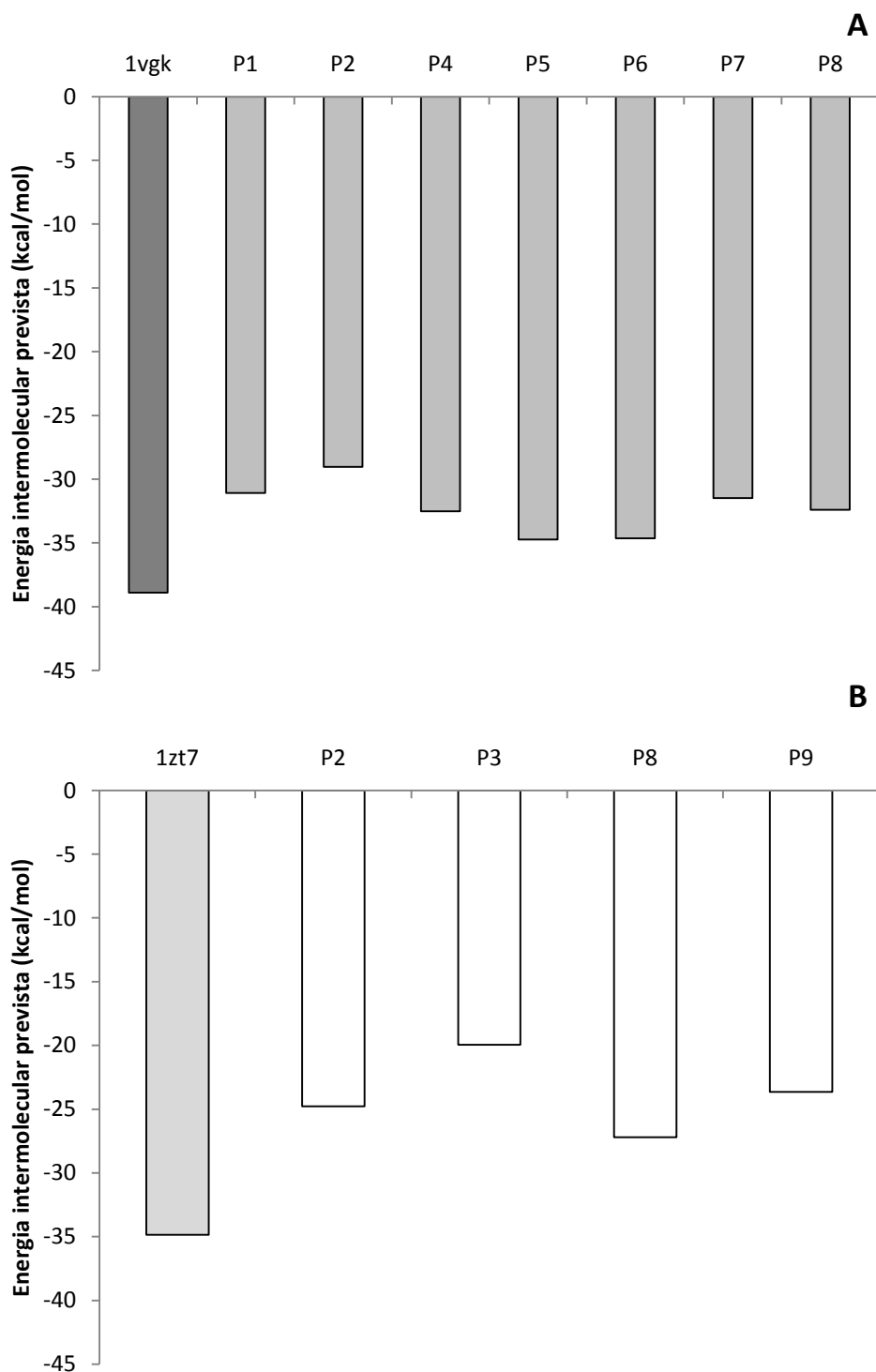


Figura 8 – Energia intermolecular prevista (kcal/mol) para os complexos H-2/epitopos pelos ensaios de *Molecular Docking in silico*. Os epitopos P1, P2, P4, P5, P6, P7 e P8 foram testados com moléculas de H-2K^d – Balb/c (A), enquanto os epitopos P2, P3, P8 e P9 foram testados com moléculas de H-2K^k – CBA (B). Ensaios de controle foram realizados submetendo os peptideos originalmente co-cristalizados com as moléculas de H-2 a ensaios de *Molecular Docking* [códigos do PDB: 1vgk (para H-2K^d) e 1zt7 (para H-2K^k)].

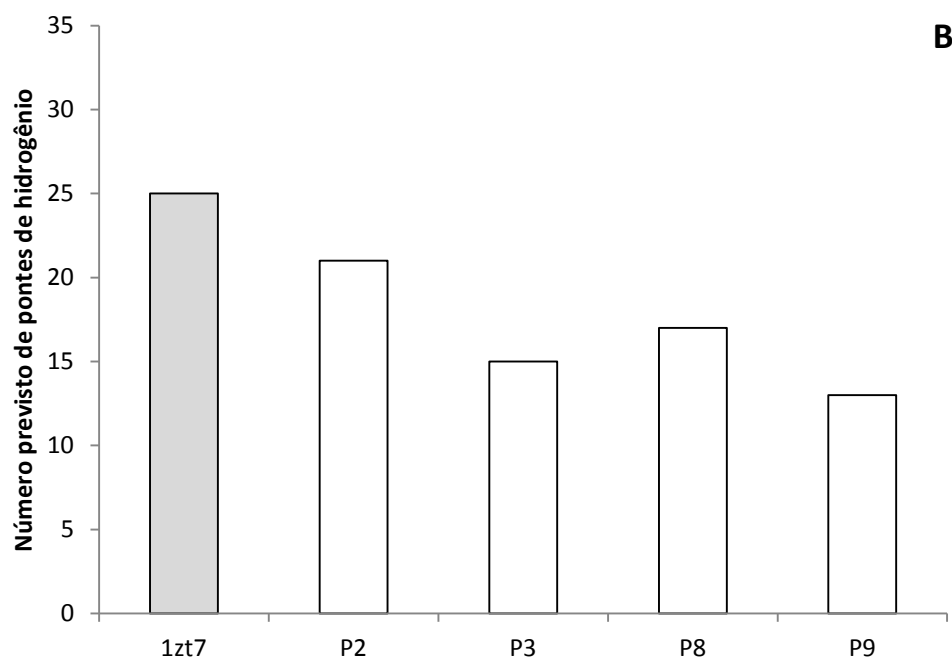
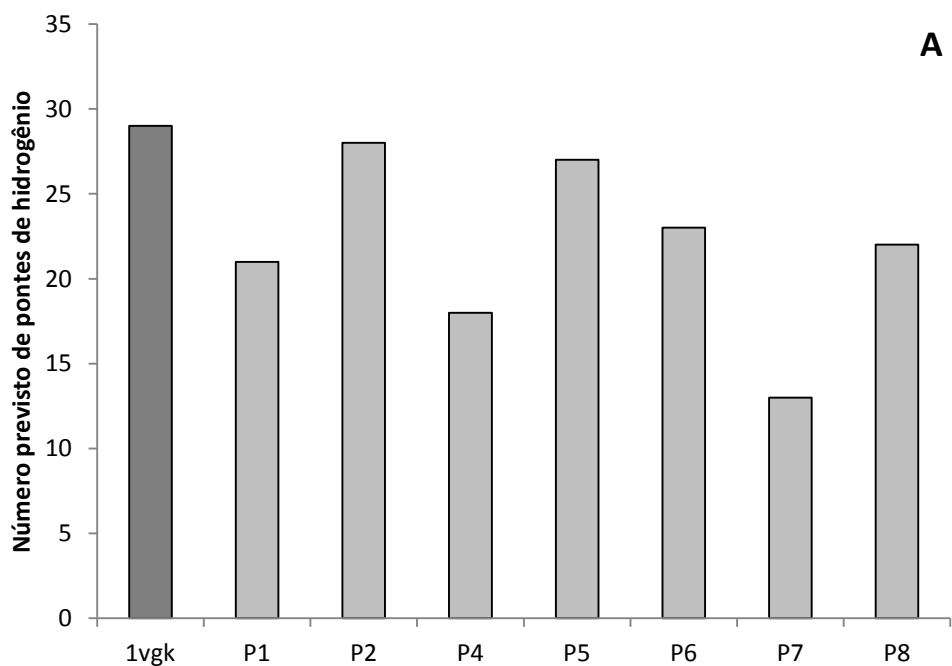


Figura 9 – Número previsto de pontes de hidrogênio formadas para os complexos H-2/epitopos pelos ensaios de *Molecular Docking in silico*. Os epitopos P1, P2, P4, P5, P6, P7 e P8 foram testados com moléculas de H-2K^d – Balb/c (A), enquanto os epitopos P2, P3, P8 e P9 foram testados com moléculas de H-2K^k – CBA (B). Ensaios de controle foram realizados submetendo os peptideos originalmente co-cristalizados com as moléculas de H-2 a ensaios de *Molecular Docking* [códigos do PDB: 1vgk (para H-2K^d) e 1zt7 (para H-2K^k)].

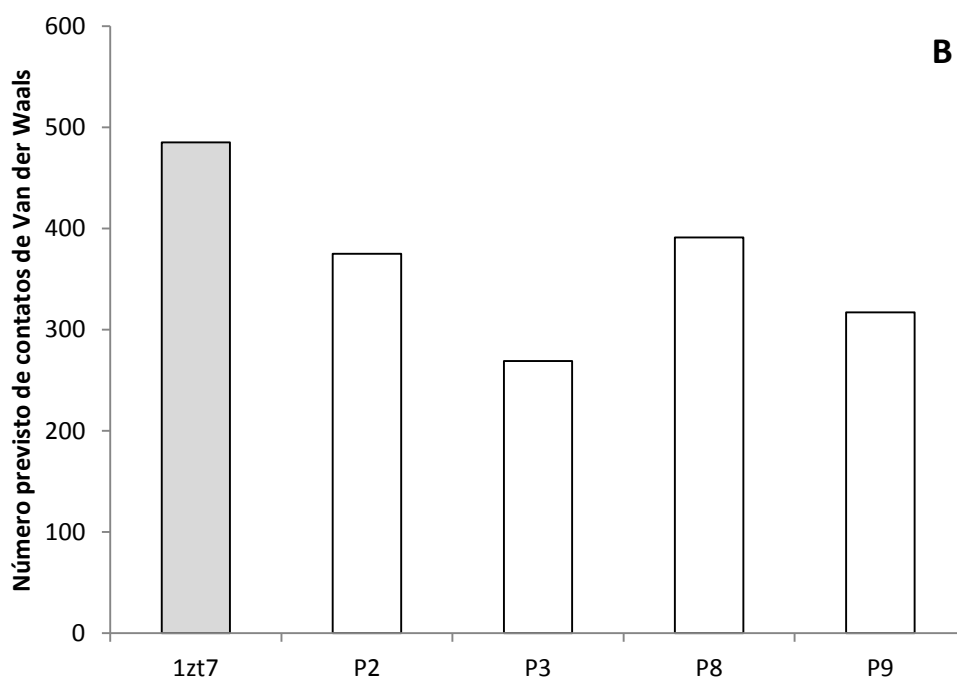
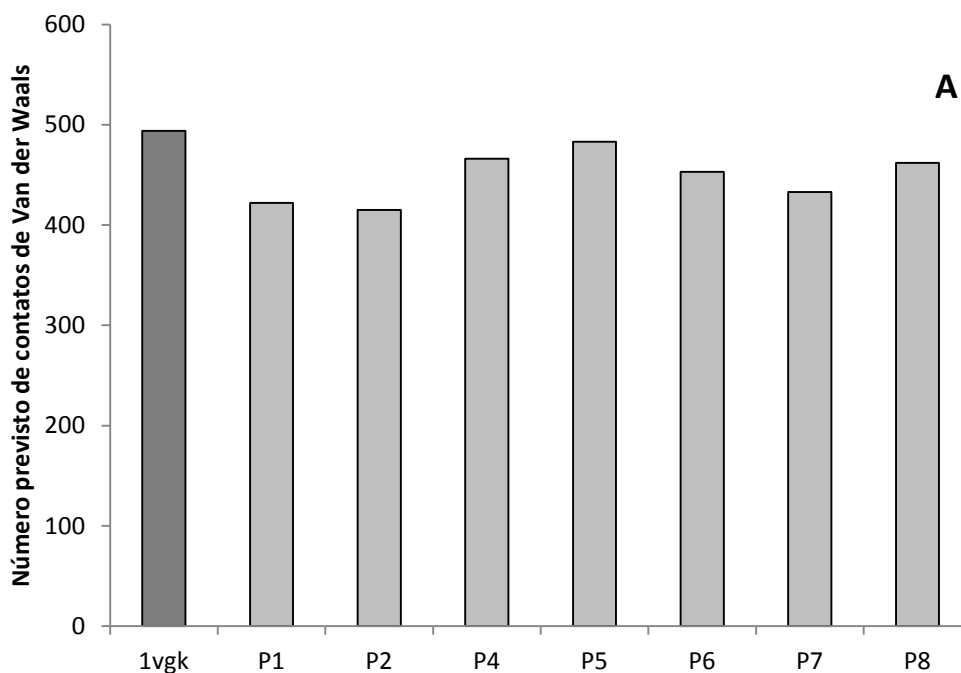


Figura 10 – Número previsto de contatos de Van der Waals formados para os complexos H-2/epitopos pelos ensaios de *Molecular Docking in silico*. Os epitopos P1, P2, P4, P5, P6, P7 e P8 foram testados com moléculas de H-2K^d – Balb/c (A), enquanto os epitopos P2, P3, P8 e P9 foram testados com moléculas de H-2K^k – CBA (B). Ensaio de controle foram realizados submetendo os peptídeos originalmente co-cristalizados com as moléculas de H-2 a ensaios de *Molecular Docking* [códigos do PDB: 1vgk (para H-2K^d) e 1zt7 (para H-2K^k)].

Para moléculas de H-2K^k, os resíduos com importância para os dois tipos de interação são: asparagina 70, asparagina 77, tirosina 99, tirosina 16, triptofano 147 e asparagina 156, enquanto os resíduos com importância apenas para contatos de Van der Waals são: tirosina 7, arginina 97, tirosina 123, arginina 155 e tirosina 159.

Além disso, a participação de determinados resíduos das fendas das moléculas de MHC na interação foi predominante ou exclusiva para epítopos que promoviam a expressão de uma citocina específica ou de uma combinação de citocinas nas células em cultura.

Assim, no caso dos camundongos BALB/c, os epítopos preditos capazes de promover a expressão de IL-10, P4 e P6, apresentaram com exclusividade a capacidade de formar pontes de hidrogênio com o resíduo tirosina 7 e contatos de Van der Waals com o resíduo cisteína 164. Além disso, mostraram a capacidade de formar mais pontes de hidrogênio com os resíduos triptofano 73 e tirosina 159 e contatos de Van der Waals com o resíduo tirosina 173 do que os demais epítopos.

Nessa mesma linhagem, os epítopos capazes de promover a expressão de IFN- γ , P2 e P4, apresentaram a maior capacidade de formar pontes de hidrogênio com o resíduo glicina 63 e a capacidade exclusiva de formar contatos de Van der Waals com os resíduos fenilalanina 33 e serina 77.

O epítopo capaz de induzir à expressão de IL-12 nas células de BALB/c em cultura, o P1, não apresentou interações exclusivas, mas uma maior capacidade de formar pontes de hidrogênio com os resíduos triptofano 147 e aspartato 152.

O epítopo P4, que se mostrou capaz de promover a expressão tanto de IL-10 quanto IFN- γ , foi o único a formar pontes de hidrogênio com o resíduo tirosina 171 e contatos de Van der Waals com os resíduos triptofano 133 e glicina 149. Além disso, esse epítopo apresentou uma maior capacidade de formar pontes de hidrogênio com o resíduo tirosina 156 e contatos de Van der Waals com o resíduo glicina 63.

Nos camundongos CBA, os epítopos capazes de promover a expressão de IL-10, P8 e P9, apresentaram a capacidade exclusiva de formar pontes de hidrogênio com o resíduo arginina 155 e com a molécula de água conservada 373 da fenda da molécula de H-2K^k.

Ainda nessa linhagem, os epítopos capazes de promover a expressão de IL-12, P2, P3 e P9, não apresentaram a formação exclusiva de pontes de hidrogênio com os resíduos, mas sim de contatos de Van der Waals com os resíduos glicina 65, glicina 69 e fenilalanina 74. Esses mesmos epítopos apresentaram uma maior

capacidade de formar pontes de hidrogênio com o resíduo aspartato 156 e contatos de Van der Waals com o resíduo asparagina 7 do que os demais epitopos testados.

Por fim, o epitopo que mostrou-se capaz de promover a expressão de IL-10 e IL-12 nas mesmas células em cultura, o P9, apresentou a capacidade exclusiva de formar pontes de hidrogênio com o resíduo tirosina 45 e contatos de Van der Waals com o resíduo aspartato 152.

9. Seleção dos iniciadores oligonucleotídicos e padronização das condições de termociclagem para ensaios de PCR

Para o acompanhamento da expressão de fatores imunológicos do hospedeiro e de possíveis fatores de virulência da *L. (L.) amazonensis* ao longo da infecção experimental murina foi necessário a escolha de iniciadores para os ensaios de PCR.

Com este fim, foram definidas sequências nucleotídicas de interesse para os genes-alvo escolhidos (moléculas de H-2 classes I e II de camundongos e CPB e CPC de *Leishmania*) e para os genes-controle (β -actina de camundongo e α -tubulina de *Leishmania*) e estas foram então aplicadas no algoritmo *online Primer3* para a definição das sequências-candidatas a iniciadores. As sequências mais adequadas, margeando regiões de amplificação de tamanho compatível com ensaios de PCR em tempo real, foram selecionadas (Tabela VI) e sintetizadas.

Procedeu-se então a verificação da especificidade e funcionalidade dos iniciadores sintetizados, através de uma série de ensaios de PCR convencional. Em paralelo, as condições mais adequadas de termociclagem, assim como as concentrações ótimas dos reagentes, foram determinadas.

A temperatura ótima de hibridização dos iniciadores aos seus alvos foi determinada por ensaios de PCR com gradiente de temperatura em um termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf International, EUA). Os ajustes nas condições dos ensaios de PCR foram considerados satisfatórios quando uma única banda era visível após a eletroforese dos produtos das reações em um gel de agarose a 2%.

Sob as condições estabelecidas, os produtos de amplificação de todos os alvos testados apresentavam tamanhos (em pb) compatíveis àqueles previstos na etapa de desenho dos iniciadores (Figura 11).

Subsequentemente, esses produtos foram sequenciados e analisados por BLAST para se verificar a especificidade dos iniciadores desenhados. Os resultados

Tabela VI – Pares de iniciadores desenhados para a análise da expressão de genes-alvo no parasito e no hospedeiro por ensaios de PCR em tempo real

Gene-alvo	Sequências dos iniciadores	Tamanho previsto do produto (pb)
α -tubulina de <i>Leishmania</i>	Forward: 5'-TCAAGTGCGGCATCAACTAC-3' Reverse: 5'-GAGTTGGCAATCATGCACAC-3'	91
CPB de <i>Leishmania</i>	Forward: 5'-AGGAGTTCAAGCGGACGTA-3' Reverse: 5'-CAGGTTGCGCTCGAAGTT-3'	84
CPC de <i>Leishmania</i>	Forward: 5'-AAATGCAACACCACCTGTGA-3' Reverse: 5'-TTCGCCCTTGATGGAGTAAG-3'	81
β -actina de camundongo	Forward: 5'-GTTTTGTTTTGGCGCTTTTG-3' Reverse: 5'-AACTTTGGGGGATGTTTGCT-3'	88
MHC classe I de camundongo	Forward: 5'-CGCTGAGGTATTTTCGAGACC-3' Reverse: 5'-AACTCCGTGTTGTCCACGTA-3'	88
MHC classe II de camundongo (cadeia- α)	Forward: 5'-GTGGATCACTGGGGCTTG-3' Reverse: 5'-GACCCACAAACAACCCAAGA-3'	115

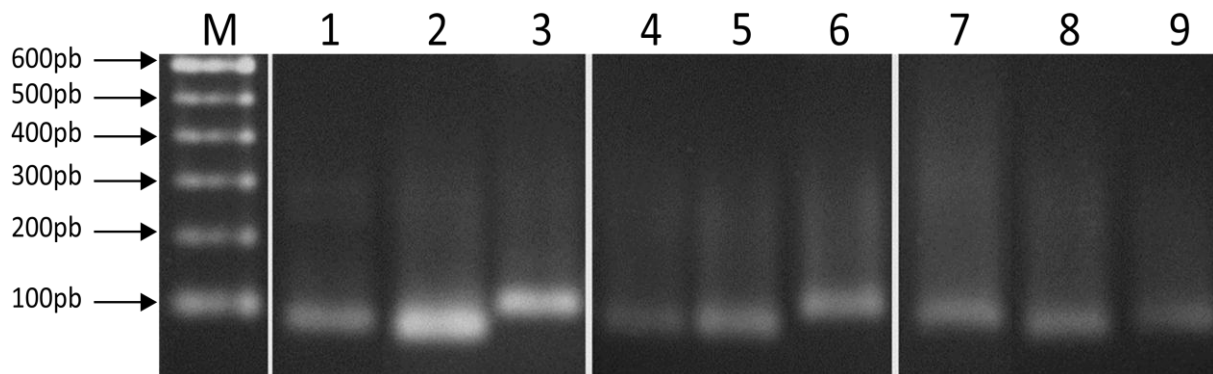


Figura 11 – Análise dos produtos de amplificação em gel de agarose a 2%. (M) marcador 100pb de DNA (Invitrogen), utilizado para a estimativa do peso molecular dos produtos. (1 – 3) produtos de PCR utilizando os iniciadores para β -actina, MHC classe I e MHC classe II (cadeia- α) de camundongo, respectivamente, com amostras de cDNA de coxim plantar de camundongos CBA. (4 – 6) produtos de PCR utilizando os iniciadores para β -actina, MHC classe I e MHC classe II (cadeia- α) de camundongo, respectivamente, com amostras de cDNA de coxim plantar de camundongos BALB/c. (7 – 9) produtos de PCR utilizando os iniciadores para α -tubulina, CPB e CPC de *Leishmania*, respectivamente, com amostras de cDNA de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em fase exponencial de crescimento.

demonstraram que cada produto de amplificação foi alinhado como similar a uma sequência compatível com a sequência-alvo esperada (Tabela VII).

10. Padronizações para os ensaios de PCR em tempo real

As condições de termociclagem dos ensaios de PCR em tempo real foram adaptadas das condições ótimas estabelecidas nos ensaios de PCR convencional. Nessas condições, um único pico era visível na curva derivativa de dissociação, construída após a reação de amplificação, indicando a formação de apenas um produto por cada par de iniciadores utilizado com as amostras de cDNA.

A temperatura de dissociação para cada produto de amplificação testado nos ensaios de PCR em tempo real está listada na Tabela VIII. Os produtos de amplificação desses ensaios também foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%, extraídos do gel e sequenciados. Os resultados obtidos foram idênticos aos observados para os produtos dos ensaios de padronização por PCR convencional.

A combinação de par de iniciadores e amostra de cDNA que apresentou a eficiência mais baixa foi: iniciadores para MHC de classe I de camundongo e amostra de cDNA do coxim plantar de camundongos CBA, com índice de eficiência de 58%. As demais combinações apresentaram índices de eficiência variando de 78% a 112% (Tabela VIII).

Todos os índices de eficiência de amplificação foram considerados nos cálculos da expressão relativa dos genes-alvo e utilizados na correção dos valores dos Cts.

11. Expressão relativa dos genes de MHC durante o curso da infecção experimental por *L. (L.) amazonensis* em camundongos

Nos ensaios de análise da expressão relativa dos genes-alvo de MHC em camundongos durante a infecção experimental, utilizamos as cepas BALB/c e CBA, que, conforme previamente indicado, apresentam diferentes níveis de susceptibilidade à infecção, para verificar se essa tais distinções estariam ligada a diferenças na expressão dos genes de MHC.

No sítio da lesão de camundongos BALB/c, os níveis de RQ de genes de MHC classe I mostraram uma tendência de aumento a partir da 8ª semana de infecção, estando fora do limiar de detecção do ensaio nas semanas anteriores.

Tabela VII – Resultados da análise de produtos de PCR dos genes-alvo de *Leishmania* e camundongo pela ferramenta NCBI BLAST

Gene-alvo do produto	Sequência-resultado com maior índice de similaridade	Valor esperado do BLAST ^a	Escore no BLAST (bits) ^b
α -tubulina de <i>Leishmania</i>	<i>Leishmania major</i> alpha tubulin (LmjF13.0390) mRNA [GenID 5650068 LmjF13.0390]	4×10^{-13}	73,4
CPB de <i>Leishmania</i>	<i>Leishmania mexicana</i> mRNA for cysteine proteinase [GenBank Z14061.1]	5×10^{-15}	84,2
CPC de <i>Leishmania</i>	<i>L.mexicana</i> lmcpc gene cathepsin B-like cysteine proteinase [GenBank Z48599.1]	1×10^{-10}	63,9
β -actina de camundongo [CBA]	<i>Mus musculus</i> actin, beta cytoplasmic (Actb) mRNA [Map Viewer NM_007393.2]	2×10^{-13}	80,6
MHC classe I de camundongo [CBA]	PREDICTED: <i>Mus musculus</i> similar to MHC class I histocompatibility antigen H-2 Q4 alpha chain precursor - mouse (LOC436493) misc RNA [GeneID 436493 H2-gs10]	4×10^{-05}	53,6
MHC classe II de camundongo (cadeia- α) [CBA]	<i>Mus musculus</i> histocompatibility 2, class II antigen E alpha (H2-Ea) mRNA [Map Viewer NM_010381.2]	1×10^{-19}	102
β -actina de camundongo [BALB/c]	<i>Mus musculus</i> actin beta, cytoplasmic (Actb) mRNA [Map Viewer NM_007393.2]	3×10^{-14}	82,4
MHC classe I de camundongo [BALB/c]	PREDICTED: <i>Mus musculus</i> MHC c6/g2 (Qa-2) protein (LOC634869) mRNA [GeneID 634869 LOC634869]	3×10^{-07}	59,0
MHC classe II de camundongo (cadeia- α) [Balb/c]	<i>Mus musculus</i> histocompatibility 2, class II antigen E alpha (H2-Ea) mRNA [Map Viewer NM_010381.2]	4×10^{-13}	82,4

^aO valor esperado de BLAST indica o número de vezes que a presente sequência-resultado ou outra com maior índice de similaridade com a sequência do produto analisado surgiria como resultado da análise por BLAST por puro acaso. Um valor esperado baixo indica um alto grau de significância para o resultado. ^bO escore no BLAST (S') é um valor normalizado derivado do valor do escore (S) não-tratado, obtido pelo uso da seguinte fórmula: $S' = (\lambda S - \ln K) / (\ln 2)$, onde K e λ são parâmetros estatísticos do sistema de pontuação. O valor de escore no BLAST é útil para a comparação do grau de significância dos resultados de análises por BLAST distintas.

Tabela VIII – Análise da especificidade dos pares de iniciadores e da eficiência de amplificação das combinações de pares de iniciadores e amostras de cDNA nos ensaios de PCR em tempo real

Gene-alvo	Temperatura de dissociação (°C) ^a	Nível de eficiência da PCR (%) ^b
α -tubulina de <i>Leishmania</i>	85,2	78
CPB de <i>Leishmania</i>	85,2	92
CPC de <i>Leishmania</i>	78,5	82
β -actina de camundongo [CBA]	77,9	101
MHC classe I de camundongo [CBA]	83,0	58
MHC classe II de camundongo (cadeia α) [CBA]	79,7	86
β -actina de camundongo [BALB/c]	77,9	112
MHC class I de camundongo [BALB/c]	83,4	83
MHC classe II de camundongo (cadeia- α) [Balb/c]	79,0	87

^aA temperatura de dissociação é determinada como a temperatura em que 50% dos produtos de amplificação encontram-se dissociados (em fita simples). ^bNível de eficiência da PCR representa a porcentagem de cópias dos produtos de amplificação presentes no início de cada ciclo da PCR que se encontra duplicada ao final do ciclo, conforme determinado pela intensidade de fluorescência.

Já os genes de MHC classe II apresentaram picos nos níveis de RQ nas 8ª e 12ª semanas de infecção, com uma tendência de queda na expressão nas últimas semanas de infecção analisadas.

Os níveis de RQ de genes de MHC classe II apresentaram-se, de uma forma geral, mais elevados que os de genes de MHC classe I (Figura 12A).

No sítio do linfonodo poplíteo drenante da lesão dessa linhagem, os genes de MHC classe II apresentaram uma tendência de queda nos níveis de RQ durante as primeiras semanas de infecção, com um discreto aumento próximo à 14ª semana. Os níveis de RQ dos genes de MHC classe I mostraram-se constantemente baixos ao longo do período de infecção analisado. Mais uma vez, notou-se a tendência dos níveis de RQ de genes de MHC classe II serem mais elevados que os de genes de MHC classe I (Figura 12B).

Uma característica interessante observada foi a tendência de genes de ambas as classes de MHC de apresentarem níveis de RQ mais elevados no sítio de lesão do que no sítio do linfonodo poplíteo drenante, nas duas linhagens murinas testadas.

Em camundongos CBA, os níveis de RQ de genes de MHC classe I no sítio da lesão apresentaram seu pico mais elevado na 10ª semana de infecção, seguindo-se uma queda abrupta nos valores e um novo pico de expressão, porém mais discreto, na 18ª semana.

A análise de níveis de RQ dos genes de MHC classe II no sítio da lesão indica um aumento nos níveis de expressão desses genes até a 12ª semana, seguindo-se uma tendência a queda e depois uma recuperação nos níveis de expressão até a 18ª semana.

Contrastando com os padrões de expressão de camundongos BALB/c, os níveis de RQ dos genes de MHC classe I em CBA foram, em todo o período analisado, mais elevados que os dos genes de MHC classe II (Figura 13A).

No linfonodo poplíteo drenante da lesão em camundongos CBA, os níveis de RQ dos genes das duas classes de MHC foram bastante similares. Nesse sítio de estudo, os genes de ambas as classes de MHC apresentaram picos de expressão na 8ª e 16ª semana de infecção com uma tendência de expressão mais baixa em torno da 10ª semana (Figura 13B).

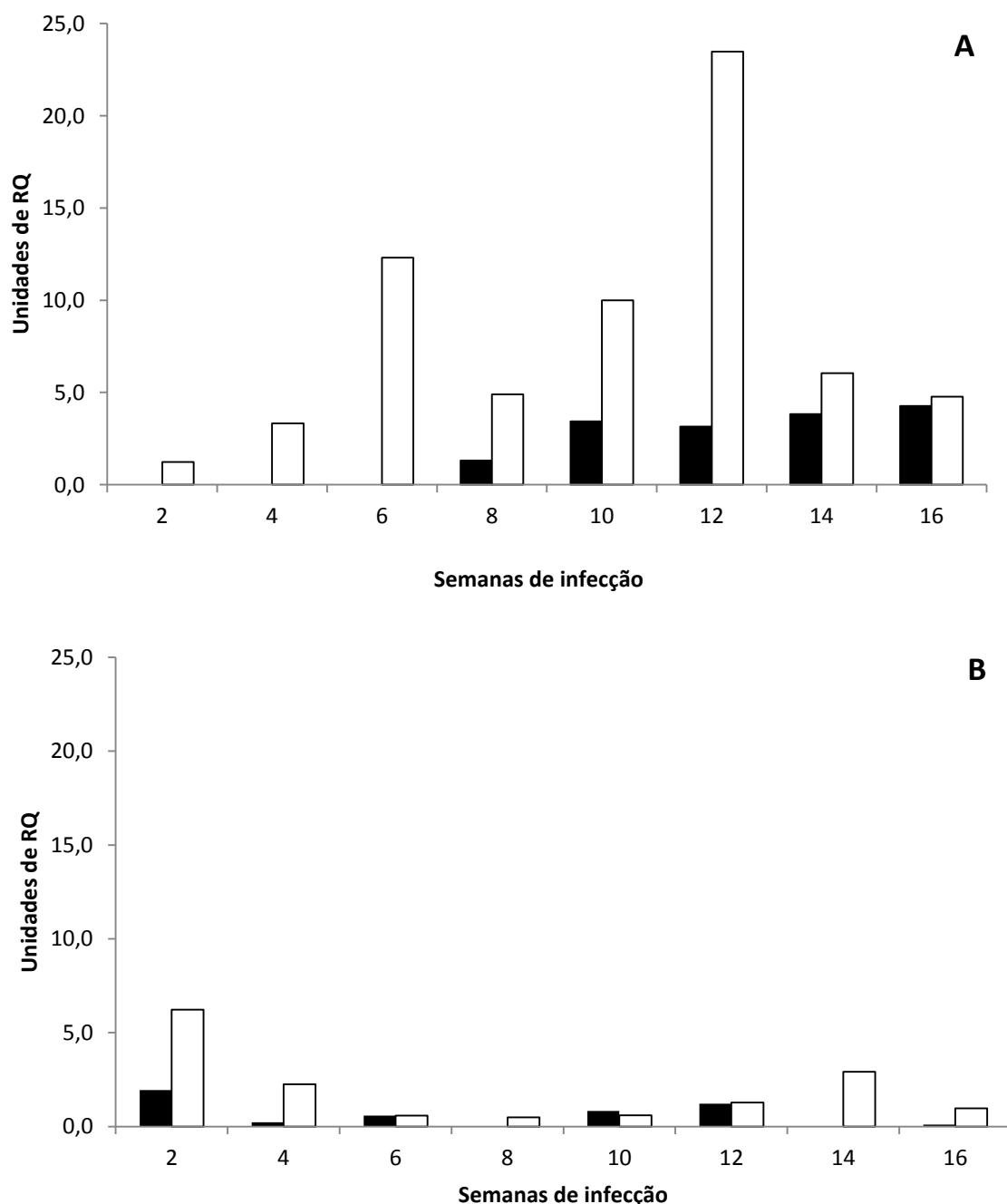


Figura 12 – Níveis de expressão de genes de MHC classe I (■) e classe II (□) de camundongos BALB/c ao longo da infecção experimental com *L. (L.) amazonensis*. Amostras do sítio da lesão (A) e de seu linfonodo poplíteo drenante (B) foram coletadas de 2 em 2 semanas após a inoculação de $1,0 \times 10^6$ promastigotas em fase logarítmica de crescimento no coxim plantar desses animais. As amostras foram coletadas até a 16^a semana. Os resultados estão expressos em unidades de quantidade relativa (RQ). O gene de β -actina de camundongo foi utilizado como controle endógeno de expressão e amostras de cDNA do coxim plantar de camundongos saudáveis como calibradores. Os dados apresentados na figura são representativos de pelo menos três ensaios independentes.

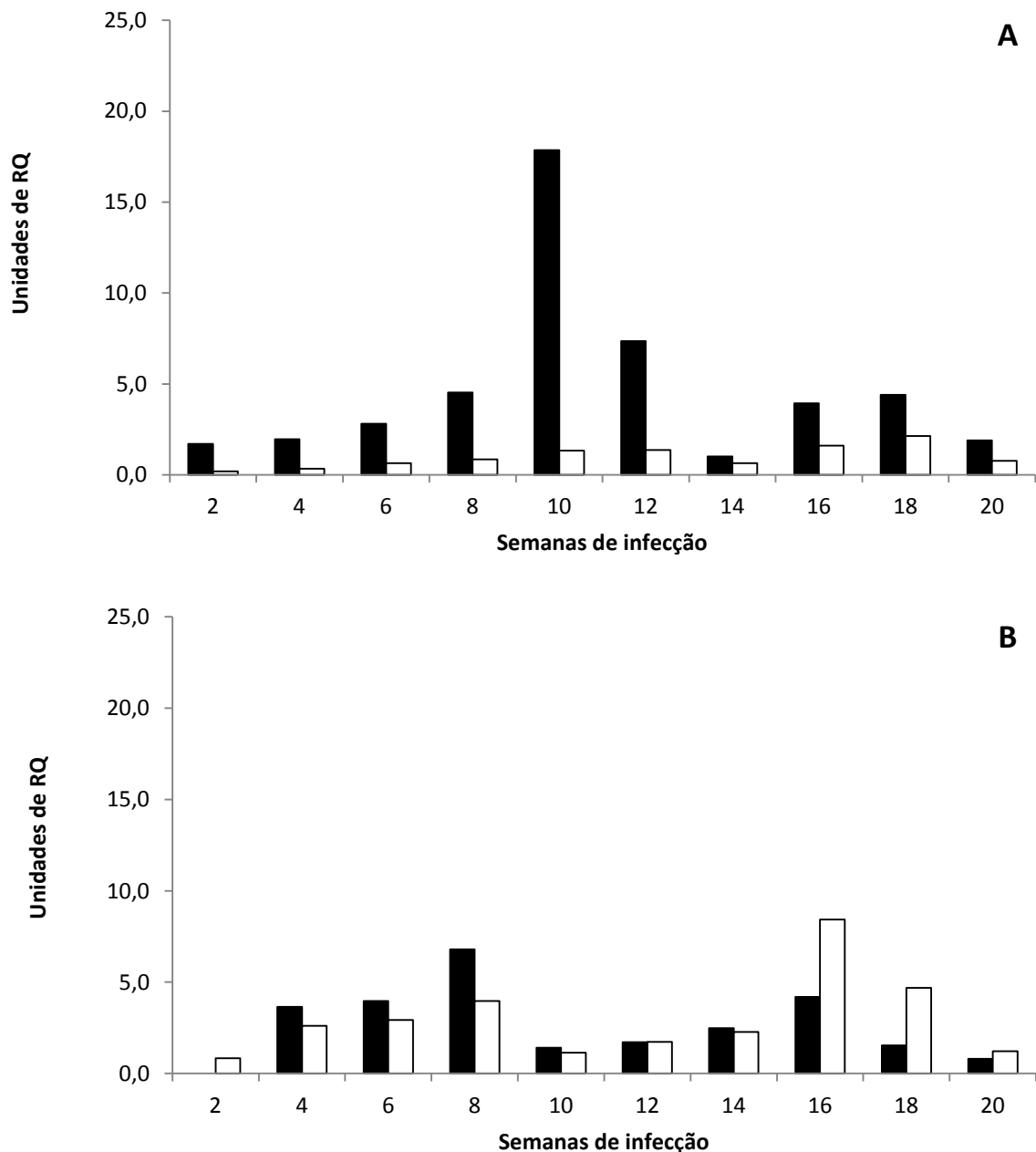


Figura 13 – Níveis de expressão de genes de MHC classe I (■) e classe II (□) de camundongos CBA ao longo da infecção experimental com *L. (L.) amazonensis*. Amostras do sítio da lesão (A) e de seu linfonodo poplíteo drenante (B) foram coletadas de 2 em 2 semanas após a inoculação de $1,0 \times 10^6$ promastigotas em fase logarítmica de crescimento no coxim plantar desses animais. As amostras foram coletadas até a 20ª semana. Os resultados estão expressos em unidades de quantidade relativa (RQ). O gene de β -actina de camundongo foi utilizado como controle endógeno de expressão e amostras de cDNA do coxim plantar de camundongos saudáveis como calibradores. Os dados apresentados na figura são representativos de pelo menos três ensaios independentes.

12. Predominância da expressão de genes de CPB de *L. (L.) amazonensis* sobre os genes de CPC durante a infecção experimental murina

Os níveis de RQ para os genes de CPB e CPC somente tornaram-se detectáveis nas condições do ensaio de PCR em tempo real a partir da 8ª semana de infecção, em ambos os sítios testados, lesão e linfonodo, das duas linhagens de camundongos.

Dessa forma, um estudo de acompanhamento da expressão desses genes ao longo do período de infecção estabelecido não foi possível. Entretanto, observou-se que os níveis de RQ de genes de CPB foram invariavelmente mais elevados que os dos genes de CPC.

Essa diferença nos níveis de RQ foi similar para ambos os sítios testados, tanto em camundongos BALB/c quanto CBA, conforme mostrado no conjunto de resultados representativos apresentados na Figura 14.

Também foi interessante a observação de que os níveis de RQ para os genes de CPB apresentaram uma tendência de valores de RQ mais elevados em camundongos BALB/c do que em camundongos CBA, não sendo um perfil semelhante ao observado para os genes CPC.

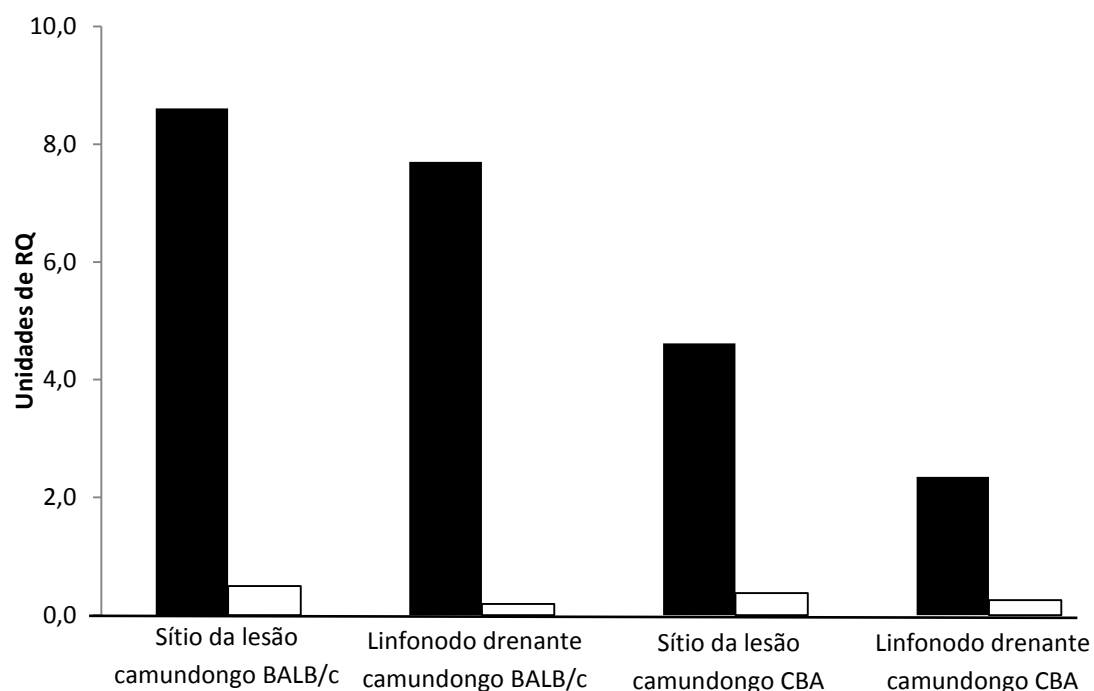


Figura 14 – Níveis de expressão de genes de CPB (■) e CPC (□) de *L. (L.) amazonensis* nos sítios da lesão ou de seu linfonodo poplíteo drenante em camundongos das linhagens BALB/c e CBA na 12^a semana de infecção. Os resultados estão expressos em níveis de quantidade relativa (RQ). O gene de α -tubulina de *Leishmania* foi utilizado como controle endógeno de expressão e amostras de cDNA de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em fase de crescimento logarítmica como calibradores. Os dados apresentados na figura são representativos de pelo menos três ensaios independentes.

DISCUSSÃO

O modelo murino de infecção experimental com parasitos do gênero *Leishmania* apresenta uma série de vantagens para o estudo da rede de interações parasito-hospedeiro. Este modelo é favorável, pois demonstra boa flexibilidade para a análise de peculiaridades específicas dos processos de infecção e um alto nível de controle das características desejadas do hospedeiro, tendo sido dessa forma eleito para o uso nesse estudo. Tais vantagens são obtidas, em especial, pelo uso de animais de linhagens isogênicas ou geneticamente modificadas, conforme revisamos, com foco especial em infecções por *L. (L.) amazonensis* (Pereira & Alves, 2008).

O processo de infecção pela *L. (L.) amazonensis*, assim como por outras espécies do gênero *Leishmania*, mostra um elevado grau de complexidade. Observa-se uma série de fatores, tanto do parasito quanto do hospedeiro, os quais interagem entre si e influenciam sistemas nesses dois organismos, como o sistema imune no hospedeiro e o sistema de virulência no parasito, a alterar e ajustar suas respostas, determinando assim o curso da infecção

Para as infecções por *L. (L.) major*, um desses ajustes de resposta que influenciam no resultado da infecção já está bem determinado para o modelo murino. Trata-se do paradigma das respostas Th1 e Th2, onde o primeiro tipo está associado ao controle da infecção, enquanto o segundo a seu aumento (Alexander & Bryson, 2005). Já no estado da arte sobre a infecção murina por parasitos do complexo *L. (L.) mexicana*, como a *L. (L.) amazonensis* esse paradigma não está bem definido. No entanto, associa-se uma resposta Th2 à susceptibilidade das linhagens à infecção (Reiner & Locksley, 1995; McMahon-Pratt & Alexander 2004; Alexander & Bryson, 2005).

Como observado na literatura, essa pouca compreensão dos processos de resposta do hospedeiro é acompanhada por uma lacuna de dados também nas informações sobre os mecanismos de resposta dos parasitos. Ou seja, os fatores do parasitos que estariam atuando no equilíbrio das respostas Th1/Th2 no hospedeiro ainda não estão suficientemente descritos. Contudo, existem estudos que apontam à identidade de alguns desses fatores, como as enzimas CPB e a extensão COOH-terminal dessas. Estas enzimas demonstram ter o potencial de atuar diretamente sobre o sistema imune do hospedeiro, conduzindo este sistema a tipos de resposta

que favoreçam a sobrevivência do parasito, como a resposta Th2 (de Souza Leão et al. 1995; Cameron et al., 2004; Alves et al., 2004).

Com base nesses dados, focamos inicialmente nossas análises em quantificações da expressão de fatores do parasito e do hospedeiro envolvidos na infecção. Devido a seus altos índices de sensibilidade e especificidade, a técnica de PCR em tempo real pode ser uma ferramenta útil para a compreensão da regulação de genes associados a interações hospedeiro-parasito. Esse tipo de análise pode identificar os papéis que fatores imunes do hospedeiro e fatores de virulência do parasito desempenham na evolução da infecção e, também, como os vários estágios da infecção podem influenciar na expressão de genes em ambos os organismos.

De fato, um estudo recente demonstrou a existência de padrões de expressão gênica diferenciados em macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*, o que aponta para a relevância dos efeitos deste parasito sobre a regulação da expressão gênica em células do hospedeiro (Osorio y Fortéa et al., 2009). Dessa forma, empreendemos a combinação das muitas vantagens dessa ferramenta de biologia molecular, com alta sensibilidade, a um modelo de infecção experimental já bem estudado para leishmanioses, como o modelo murino, de forma a estabelecer uma metodologia flexível que permitisse maior precisão para as análises da complexa rede de interações parasito/hospedeiro.

Para nosso estudo, selecionamos genes codificadores de fatores importantes para as respostas dos linfócitos T em camundongos infectados pela *L. (L.) amazonensis*, pelo grande efeito que as respostas de linfócitos T auxiliares têm na evolução da infecção (Alexander & Bryson, 2005). Não obstante, a ativação de outro tipo de linfócitos T, citotóxicos (CD8+), também tem influência direta no controle da infecção (Hernández-Ruiz & Becker, 2006). Os genes do hospedeiro eleitos para o estudo foram os codificadores de moléculas do MHC e nos parasitos, os codificadores de enzimas CPs. Levando em consideração que nossas análises se baseavam em genes do sistema imune do hospedeiro, optamos por analisar os padrões de expressão desses genes em sítios em que alterações nesses padrões durante a infecção seriam mais relevantes e, dessa forma, focamos os estudos no sítio de inóculo dos parasitos (lesão) e seu linfonodo drenante.

Devido às diferenças de susceptibilidade das linhagens de camundongos estudadas, BALB/c e CBA, consideramos que os padrões de expressão de genes relacionados à infecção poderiam ter variações ligadas a estas diferenças. Especulamos se os diferentes haplotipos desses animais poderiam explicar suas diferentes capacidades de lidar com os parasitos e assim o perfil genético desses animais estaria influenciando a forma como estes respondiam imunologicamente às CPs de *Leishmania* (Alves et al., 2004).

Os resultados para os padrões de expressões dos genes do MHC nas linhagens estudadas foram compatíveis com essa hipótese, uma vez que os genes do MHC classe I apresentaram valores de expressão relativa mais elevados em camundongos CBA, enquanto em camundongos BALB/c os genes do MHC classe II foram mais expressos. Esses resultados são bastante interessantes, pois demonstram que na linhagem mais susceptível (BALB/c) há uma maior expressão de genes de uma classe do MHC que pode levar a uma resposta ineficaz contra a infecção por *Leishmania* (a resposta Th2), enquanto, na linhagem mais resistente (CBA), a classe de MHC mais expressa está relacionada à ativação de linfócitos T citotóxicos, células que podem auxiliar no controle da infecção (Colmenares et al., 2003).

Dessa forma, essa expressão mais elevada do MHC classe II em BALB/c, em ambos os sítios de infecção estudados, pode ainda estar relacionada a outro papel dos linfócitos T auxiliares na infecção, pois já se observou que a ausência desse tipo celular é benéfico para o controle da infecção por *Leishmania* pelo hospedeiro (Silva et al., 1994). Os camundongos CBA apresentaram uma predominância da expressão dos genes do MHC classe I ao longo de todo o período de infecção estudado no sítio da lesão. No entanto, o padrão observado no linfonodo foi distinto, ocorrendo uma inversão da classe do MHC predominantemente expressa a partir da 16ª semana de infecção: de classe I para classe II. Esses dados podem refletir a tendência que a infecção segue nesta linhagem de camundongo, uma vez que camundongos CBA têm um perfil de pequenas lesões com lenta e progressiva evolução (Neal & Hale, 1983).

Assim a expressão de genes MHC classe I no sítio da lesão pode ser relacionada com a propriedade do hospedeiro de controlar a progressão das lesões. No entanto, o parasito parece induzir uma perturbação na expressão de MHC no

linfonodo do hospedeiro. Tal variação pode estar relacionada com dados prévios de nosso grupo, os quais indicavam que linfonodos de camundongos CBA infectados com *L. (L.) amazonensis* contêm quantidades equivalentes de linfócitos T CD4+ e CD8+ (Alves et al., 2004).

Quanto à análise da expressão de genes de CPs nos parasitos, também fomos capazes de notar distinções claras entre os dois modelos murinos estudados: quando infectando camundongos BALB/c, a *L. (L.) amazonensis* tende a expressar os genes de CPB em níveis mais elevados do que em camundongos CBA. As análises da expressão de CPC não apontaram para distinções nos padrões de expressão pelo parasito nos dois modelos murinos testados. Assim, o papel da CPC na infecção murina por *Leishmania* permanece sem uma clara definição, apesar de algumas evidências de que essa enzima possua atividade imunoregulatória (Somanna et al., 2002).

A expressão de genes de CPB observada pode estar relacionada à ação direta dessa enzima, por ação proteolítica, sobre o sistema imune do hospedeiro, mas, outro efeito dessa expressão é a produção de resíduos clivados da extensão COOH-terminal dessa enzima. Conforme descrito na literatura, esses resíduos são hidrolisados (Duboise et al., 1994) quando a enzima atinge sua forma ativa final. Posteriormente, os resíduos da extensão COOH-terminal são secretados para o meio extracelular (Traub-Cseko et al., 1993), ficando disponíveis para a interação com o sistema imune do hospedeiro, conforme foi indicado pela descrição de sua presença no interior de macrófagos (Alves et al., 2005). Assim, esses resíduos poderiam ser a base para a geração de epitopos a serem apresentados aos linfócitos pelas células apresentadoras de antígenos e, desta forma, também desempenhar um papel na evolução da infecção. Este tipo de análise foi empregado anteriormente, quando nosso grupo descreveu alguns epitopos preditos da extensão COOH-terminal de CPB de *Leishmania*, por método direto de predição (Alves et al., 2001b), e verificou indícios de influência de alguns destes epitopos sobre células envolvidas nas respostas Th1/Th2 nos linfonodos de camundongos infectados (Alves et al., 2004).

No presente estudo, buscamos dar continuidade a essa linha de investigação valorizando métodos indiretos para predição de epitopos. Dessa forma, utilizamos as vantagens atuais da disponibilidade de algoritmos *online* de predição de processos

moleculares, como clivagem proteassômica e interações MHC/epitopos, para auxiliar na busca por antígenos da extensão COOH-terminal de CPB de *L. (L.) amazonensis*.

Como a descrição da sequência de aminoácidos dessa extensão COOH-terminal ainda não estava disponível na literatura, a etapa inicial de nosso estudo foi direcionada à determinação desta sequência de onde selecionamos os epitopos para as etapas seguintes. Com este fim, aplicamos técnicas de biologia molecular para obter a sequência de nucleotídeos desta extensão COOH-terminal e, então, convertê-la para a sequência de aminoácidos. As análises de alinhamento múltiplo de sequências, comparando a sequência recém-obtida com as de outras espécies de *Leishmania*, indicaram que, mesmo com o alto nível de similaridade entre as sequências de parasitos do complexo *L. (L.) mexicana*, ainda existem modificações nos resíduos de aminoácidos que são particulares de *L. (L.) amazonensis*. Tais modificações apontam à presença de epitopos exclusivos para esta espécie e que podem estar relacionados a algumas das particularidades das infecções por estes parasitos, como o estímulo de sub-populações de linfócitos T ligados à patogênese (Soong et al., 1997).

Em nossos ensaios, utilizamos APP como controle específico para os ensaios de blastogênese, fenotipagem e dosagem de níveis de expressão de citocinas. A escolha desse controle baseou-se no fato de que o APP é uma mistura contendo diversas moléculas do parasito, inclusive potencialmente nossos epitopos de interesse. Seus efeitos observados no presente estudo foram compatíveis com aqueles previamente reportados para outra mistura de antígenos de *Leishmania*, o antígeno solúvel de *L. (L.) mexicana*, o qual favorece os linfócitos T CD8+ como fenótipo predominante e induz à expressão de citocinas ligadas a ambas as respostas Th1 e Th2 (Alves et al., 2004). Alguns dos antígenos presentes nessas frações do parasito podem ter relação com as distinções observadas entre as infecções murinas com *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major*. As diferenças de antígenos expressos por essas espécies podem explicar a razão pela qual não se observam infecções com características de dupla resposta Th1/Th2 nas infecções com *L. (L.) major* (Ji et al., 2002; Sacks & Noben-Trauth, 2002).

Com base nessas observações, uma de nossas questões acerca dos epitopos estudados era: ao causar efeitos imunoregulatórios estes apresentam atividades no

mesmo sentido (reforçando em conjunto uma resposta Th1 ou Th2)? Ou estes podem ser divididos em grupos induzindo respostas diferentes? Os resultados mostraram que os diferentes epitopos preditos testados induziram a respostas Th distintas: alguns induziram à expressão de citocinas do perfil de resposta Th1 (P1 e P2, em camundongos BALB/c, e P2 e P3 em camundongos CBA) pelas células em cultura, outros do perfil Th2 (P6 em BALB/c e P8 em CBA) e, ainda, houve aqueles que induziram à expressão de citocinas de ambos os perfis (P4 em BALB/c e P9 em CBA). É interessante notar que, os linfócitos T CD8+ também podem apresentar perfis de expressão de citocinas similares aos dos linfócitos T CD4+ (Carter & Duttont, 1996) e, desta forma, podem ser o tipo celular envolvido na produção observada das citocinas. Contudo, nenhum dos epitopos preditos testados foi capaz de levar as células em cultura a produzir NO.

Essa variedade de estímulos dos epitopos testados aponta para uma possível estratégia do parasito para escapar do sistema imune do hospedeiro. Através de uma sobrecarga de estímulos pela produção de antígenos imunomodulatórios com efeitos contrários, o parasito poderia induzir o sistema imune do hospedeiro a montar uma série de respostas ineficazes, tornando o hospedeiro incapaz de controlar adequadamente a infecção. Essas respostas ineficazes seriam traduzidas pelo perfil duplo Th1/Th2 observado nas infecções experimentais de camundongos por *L. (L.) amazonensis* (Ji et al., 2002; Sacks & Noben-Trauth, 2002). Diversas linhagens murinas consanguíneas testadas em infecções experimentais com *L. (L.) amazonensis* apresentam-se susceptíveis ainda que sejam resistentes à infecção com *L. (L.) major*, ressaltando as distinções das vias de virulência entre essas duas espécies (Ji et al., 2002).

Um detalhe curioso em nossos resultados foi observado nos ensaios com um dos epitopos preditos para ambos os haplotipos de H-2K testados: quando ensaiado com células das duas linhagens de camundongos, o P9 apresentou atividades distintas, sendo capaz de induzir à expressão de citocinas relacionadas à resposta Th2 em culturas de células de camundongos CBA, mas não apresentando estímulo à produção de quaisquer citocinas em culturas de células de camundongos BALB/c.

Outra característica dos efeitos desses epitopos sobre as células de camundongo em cultura também foi notada em nossos ensaios: o estímulo à produção de citocinas parece não estar necessariamente relacionado à indução da

blastogênese nessas células. Classicamente, sabe-se que os linfócitos T são ativados por uma combinação de sinais: reconhecimento de um complexo molecular (antígeno/MHC) na superfície de células apresentadoras de antígeno e estímulo por citocinas específicas. Esses linfócitos T ativados, então, poderão iniciar uma resposta proliferativa dependente de IL-2 e de seu receptor específico (Robb, 1984). A ausência de proliferação observada em algumas das culturas ensaiadas com determinados epitopos pode representar ainda outra forma de controle do sistema imune do hospedeiro pelo parasito: a ausência de proliferação das células ativadas limita as áreas no hospedeiro onde alguma forma de resposta ao parasito estará ocorrendo, pois não haverá clones ativados disponíveis para auxiliar na resposta imune em outras áreas. Assim, análises focadas na expressão de IL-2 e seu receptor fazem-se necessárias para auxiliar na compreensão dessa característica observada nas culturas.

Apesar de alguns dos epitopos preditos selecionados em nosso estudo terem sido capazes de influenciar de alguma forma as células de camundongo em cultura, induzindo a expressão de citocinas ou iniciando um processo de blastogênese, nenhum deles causou qualquer efeito sobre o perfil de evolução das lesões em camundongos infectados quando foram utilizados em vacinação prévia: seja na proteção dos animais ou no aumento da infecção. Essa ausência de um efeito *in vivo* pode indicar que os epitopos preditos aqui testados não sejam individualmente antígenos predominantes na infecção e que seja necessária uma combinação de antígenos para efeitos observáveis no organismo hospedeiro.

Com base nos resultados obtidos, pode-se sugerir que o genótipo da linhagem murina e a capacidade do parasito de expressar genes de CPB estejam entre os fatores que definem o desenvolvimento da lesão cutânea em infecções experimentais com *L. (L.) amazonensis* em camundongos. É possível que estes fatores ajam de forma congruente, polarizando as respostas dos linfócitos T nesses animais infectados.

Para complementar as análises *in vivo* e *in vitro*, simulações moleculares complexas foram realizadas por *Molecular Docking*. A aplicação dessa combinação de metodologias é uma das recentes possibilidades de análise que foi aplicada nesse estudo, sendo que trabalhos anteriores já propuseram a aplicação da ferramenta de *Molecular Docking* para a identificação de complexos MHC/epitopos

capazes de interagir com receptores de linfócitos T (Rognan et al., 1994). Foram previstas interações exclusivas, como pontes de hidrogênio e contatos de Van der Waals, formadas por alguns resíduos de aminoácidos da fenda das moléculas do MHC com epitopos capazes de promover a expressão de citocinas específicas. Além dessas interações exclusivas, algumas outras interações, ainda que também previstas para ocorrer com outros epitopos, foram indicadas como predominantes para epitopos que induziam a expressão de determinadas citocinas.

Apesar da necessidade de complementação por análises de um número mais abrangente de epitopos desse parasito, visto que a quantidade de epitopos testados em nosso trabalho não foi o suficiente para revelar dados estatisticamente significativos, essa metodologia apresenta o potencial de indicar a existência de padrões de interação epitopo/molécula de MHC que expliquem os efeitos imunológicos específicos observados empiricamente.

Ao final de nosso estudo, nós fomos capazes de confirmar a capacidade da extensão COOH-terminal de CPB de *L. (L.) amazonensis* de influenciar na progressão da infecção em camundongos, principalmente ao alterar o equilíbrio das respostas Th1/Th2 através de epitopos presentes em sua sequência, como já havíamos anteriormente especulado (Alves et al., 2004). Quando somados aos estudos previamente publicados por nosso grupo, o conjunto de dados gerado pelo presente trabalho ajuda na compreensão de mais um aspecto das interações complexa que definem o sucesso ou fracasso da infecção murina por parasitos do gênero *Leishmania*. Além disso, acreditamos que, caso aplicada no estudo de outras potenciais moléculas imunoregulatórias do parasito, a abordagem metodológica aqui delineada pode ser de grande utilidade para rápida definição e caracterização de epitopos derivados de proteínas do parasito.

Já as análises de expressão gênica confirmaram o grande potencial do uso da técnica de PCR em tempo real para auxiliar na compreensão dos fatores envolvidos nas interações parasito/hospedeiro. Ao se acompanhar os níveis de expressão de vários genes ligados a esse fenômeno, tanto nos parasitos quanto nos camundongos, e ao se comparar dados obtidos de linhagens murinas com diferentes graus de susceptibilidade à *Leishmania*, torna-se possível estudar vários fatores envolvidos no curso da infecção, como componentes do sistema imune do hospedeiro ou fatores de virulência dos parasitos. No futuro, uma análise abrangente

dos dados sobre diversos desses fatores, pode ajudar a criar um mapa das interações que acontecem durante a infecção.

Por fim, propomos que a aplicação de estudos combinando análises de expressão gênica com análises de expressão de proteínas pode ser um caminho bastante útil para permitir um melhor entendimento dos eventos que acontecem na infecção murina por *Leishmania* e lançar bases para o desenvolvimento de novas vacinas, drogas ou protocolos de quimioterapia mais específicos e eficientes.

CONCLUSÕES

1. Os genes do MHC estão diferentemente expressos durante a infecção experimental por *L. (L.) amazonensis* entre as linhagens murinas testadas: enquanto os genes de MHC classe I são mais expressos em camundongos CBA os de MHC classe II são mais expressos em camundongos BALB/c, sendo tal efeito melhor observado em amostras do sítio da lesão;
2. Em ambas as linhagens murinas estudadas, BALB/c e CBA, a expressão dos genes de CPB é mais elevada do que o gene de CPC, nos sítios da lesão e linfonodo drenante, do início até pelo menos a 16ª semana após a infecção;
3. A expressão dos genes da enzima CPB é mais elevada na *L. (L.) amazonensis* quando infectando camundongos BALB/c do que quando infectando camundongos CBA;
4. O uso dos iniciadores de PCR específicos para a extensão COOH-terminal da *cys2* de *L. (L.) pifanoi* foi satisfatório para amplificação da sequência correspondente em genes de CPB de *L. (L.) amazonensis*, permitindo seu sequenciamento;
5. A extensão COOH-terminal da CPB de *L. (L.) amazonensis* demonstrou maior similaridade com as sequências equivalentes de espécies de seu próprio complexo (complexo *L. (L.) mexicana*) do que com as sequências de espécies de outros complexos;
6. A estratégia de mapeamento de epitopos utilizando o intercruzamento das sequências obtidas nos algoritmos SYFPEITHI, NetChop e PAPProC foi adequada para a determinação de nove epitopos preditos (entre oito e dez aminoácidos) originados da extensão COOH-terminal da CPB de *L. (L.) amazonensis*;
7. A vacinação prévia com os epitopos preditos não foi capaz de gerar influência detectável no desenvolvimento de lesões ao longo das infecções experimentais murinas;

8. A capacidade dos epitopos preditos de induzir a proliferação celular em culturas de células foi confirmada apenas para P4 e P5, em BALB/C, e P2, P8 e P9, em CBA;

9. Os epitopos preditos P5, P6 e P8 são capazes de alterar a porcentagem de linfócitos T CD8+ nas culturas de células. O P8 também é capaz de interferir na porcentagem de linfócitos CD4+ nas culturas. Contudo essa influência sobre os fenótipos dos linfócitos T não apresenta correlação evidente com a antigenicidade dos mesmos;

10. O uso de uma mistura de antígenos de *Leishmania* (APP) nos ensaios de blastogênese evidenciou que a infecção por *L. (L.) amazonensis* é capaz de primar células que induzem à síntese de citocinas Th1 e Th2, o que também foi evidenciado para alguns dos epitopos preditos;

11. Os epitopos preditos P1 e P2 induzem à expressão de citocinas relacionadas ao perfil de resposta Th1 pelas células de linfonodo de camundongos BALB/c em cultura. Já o epitopo predito P6 induz à expressão de citocinas do perfil Th2 e o P4 à expressão de citocinas de ambos os perfis (Th1/Th2).

12. Os epitopos preditos P2 e P3 induzem à expressão de citocinas relacionadas ao perfil de resposta Th1 pelas células de linfonodo de camundongos BALB/c em cultura. Já o epitopo predito P8 induz à expressão de citocinas do perfil Th2 e o P9 à expressão de citocinas de ambos os perfis (Th1/Th2).

13. A produção de NO não foi relacionada a nenhum dos epitopos preditos nas duas linhagens de camundongos testadas; embora o estímulo à sua produção tenha sido observado nas culturas de células de BALB/c e CBA, pelo uso de uma mistura de antígenos do parasito (APP);

14. Os ensaios de *Molecular Docking* apontaram indícios de interações dentro dos complexos epitopos/MHC que são específicas de epitopos capazes de induzir à produção de determinadas citocinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Tedesco RC, Mortara RA, Gonçalves da Costa SC 2003. Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Am J Trop Med Hyg* 68:661-665.
- Adler S, Ber M 1941. The transmission of *Leishmania tropica* by the bite of *Phlebotomus papatasi*. *Ind J Med* 29:803-809.
- Afonso LC, Scott P 1993. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun* 61:2952-2959.
- Alexander J, Bryson K 2005. T helper(h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett* 99:17-23.
- Alexander J, Coombs GH, Mottram JC 1998. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol* 161:6794-6801.
- Almeida RP, Barral-Netto M, De Jesus AM, De Freitas LA, Carvalho, EM, Barral A 1996. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. *Am J Trop Med Hyg* 54:178-184.
- Altamirano-Enciso AJ, Marzochi MC, Moreira JS, Schubach AO, Marzochi KB 2003. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. *Hist Cienc Saude Manguinhos* 10:852-882.
- Alves CR, Benevolo-De-Andrade TC, Alves JL, Pirmez C 2004. Th1 and Th2 immunological profile induced by cysteine proteinase in murine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 26:127-135.

- Alves CR, Corte-Real S, Bourguignon SC, Chaves CS, Saraiva EM 2005. *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation *in vitro*. *Exp Parasitol* 109: 38-48.
- Alves CR, Figueiredo LJO, Saraiva FALO, De Simone SG 2001a. Molecular modeling study on a *Leishmania* cysteine proteinase. *J Mol Struct* 539:289-295.
- Alves CR, Marzochi MC, Giovanni-de-Simone S 1993. Heterogeneity of cysteine proteinases in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania major*. *Braz J Med Biol Res* 26:167-171.
- Alves CR, Pontes de Carvalho LC, Souza AL, De Simone SG 2001b. A strategy for the identification of T-cell epitopes on *Leishmania* cysteine proteinases. *Cytobios* 104:33-41.
- Aragão H 1922. Transmissão da leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. *Bras Méd* 36:129-130.
- Aranha FC, Ribeiro U Jr, Basse P, Corbett CE, Laurenti MD 2005. Interleukin-2-activated natural killer cells may have a direct role in the control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigote and macrophage infection. *Scand J Immunol* 62:334-341.
- Arnoldi J, Moll H 1998. Langerhans cell migration in murine cutaneous leishmaniasis: regulation by tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and macrophage inflammatory protein-1 alpha. *Dev Immunol* 6:3-11.
- Azeredo-Coutinho RB, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, Pacheco RS, Valete-Rosalino CM, Mendonça SC 2007. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101:735-737.
- Balestieri FM, Queiroz AR, Scavone C, Costa VM, Barral-Netto M, Abrahamsohn I de A 2002. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect* 4:23-29.

- Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Júnior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM et al 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 44:536-546.
- Barral A, Petersen EA, Sacks DL, Neva FA 1983. Late metastatic leishmaniasis in the mouse. A model for mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg* 32:277-285.
- Bart G, Coombs GH, Mottram JC 1995. Isolation of *Imcpc*, a gene encoding a *Leishmania mexicana* cathepsin-B-like cysteine proteinase. *Mol Biochem Parasitol* 73:271-274.
- Bart G, Frame MJ, Carter R, Coombs GH, Mottram JC 1997. Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 88:53-61.
- Basano SA, Camargo LMA 2004. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev Bras Epidemiol* 7:328-337.
- Bates PA 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 37:1097-1106.
- Bennett CL, Misslitz A, Colledge L, Aebischer T, Blackburn CC 2001. Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Eur J Immunol* 31:876-883.
- Bertho AL, Santiago MA, Coutinho SG 1994. An experimental model of the production of metastasis in murine cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol* 80:93-99.
- Borovsky PF 1898. On Sart sore. *Voenno-Medicinskij Zurnal (Mil Med J)* CXCV: 925-941.

Brands SJ (comp.) 1989-present. The Taxonomicon. Universal Taxonomic Services, Zwaag, The Netherlands. [<http://taxonomicon.taxonomy.nl/>]. Data de acesso: 22/04/2010.

Brooks DR, Denise H, Westrop GD, Coombs GH, Mottram JC 2001. The stage-regulated expression of *Leishmania mexicana* CPB cysteine proteases is mediated by an intercistronic sequence element. *J Biol Chem* 276:47061-47069.

Buxbaum LU, Denise H, Coombs GH, Alexander J, Mottram JC, Scott PJ 2003. Cysteine protease B of *Leishmania mexicana* inhibits host Th1 responses and protective immunity. *Immunol* 171:3711-3717.

Calabrese KS, Da Costa SC 1992. Enhancement of *Leishmania amazonensis* infection in BCG non-responder mice by BCG-antigen specific vaccine. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87:49-56.

Calvopina M, Barroso PA, Marco JD, Korenaga M, Cooper PJ, Nonaka S, Hashiguchi Y 2006. Efficacy of vaccination with a combination of *Leishmania* amastigote antigens and the lipid A-analogue ONO-4007 for immunoprophylaxis and immunotherapy against *Leishmania amazonensis* infection in a murine model of New World cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 24:5645-5652.

Cameron P, McGachy A, Anderson M, Paul A, Coombs GH, Mottram JC, Alexander J, Plevin R 2004. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. *J Immunol* 173:3297-3304.

Carter KC, Hutchison S, Henriquez FL, Légaré D, Ouellette M, Roberts CW, Mullen AB 2006. Resistance of *Leishmania donovani* to sodium stibogluconate is related to the expression of host and parasite γ -glutamylcysteine synthetase. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 88-95.

Carter LL, Duttont RW 1996. Type 1 and Type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets. *Curr Opin Immunol* 8:336-342.

- Carvalho EM, Barral A, Pedral-Sampaio D, Barral-Netto M, Badaró R, Rocha H, Johnson WD Jr. J 1992. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. *Infect Dis* 165:535-540.
- Castro R, Scott K, Jordan T, Evans B, Craig J, Peters EL, Swiker K 2006. The ultrastructure of the parasitophorous vacuole formed by *Leishmania major*. *J Parasitol* 92:1162-1170.
- Chagas C 1909. Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- Colmenares M, Kima PE, Samoff E, Soong L, McMahon-Pratt D 2003. Perforin and gamma interferon are critical CD8+ T-cell-mediated responses in vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* infection. *Infect Immun* 71:3172-3182.
- Costa AA, Abreu AL, Gomes CM, Saldanha AC, Barral A, Costa JM, Corbett CE 2006. Experimental model of chronic osteomyelitis caused by *Leishmania (L) amazonensis*. *Acta Trop* 98:125-129.
- Courret N, Lang T, Milon G, Antoine JC 2003. Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. *Int J Parasitol* 33:1373-1383.
- Cox FE 2002. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev* 15:595-612.
- Cunningham DD 1885. On the presence of peculiar parasitic organisms in the tissue of a specimen of Delhi boil. *Sci Mem Med Off Army India* 1:21-31.
- Cupolilo SM, Souza CS, Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Goncalves da Costa SC 2003. Biological behavior of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* isolated from a human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice. *Histol Histopathol* 18:1059-1065.

- de Araújo Soares RM, dos Santos AL, Bonaldo MC, de Andrade AF, Alviano CS, Angluster J, Goldenberg S 2003. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: differential expression of proteinases and cell-surface polypeptides in avirulent and virulent promastigotes. *Exp Parasitol* 104:104-112.
- de Freitas Balanço JM, Moreira ME, Bonomo A, Bozza PT, Amarante-Mendes G, Pirmez C, Barcinski MA 2001. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol* 11:1870-1873.
- de Oliveira CI, Teixeira MJ, Gomes R, Barral A, Brodskyn C 2004. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. *Drug Discovery Today Disease Models* 1:81-86.
- de Souza Leão S, Lang T, Prina E, Hellio R, Antoine JC 1995. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci* 108:3219-3231.
- Denise H, McNeil K, Brooks DR, Alexander J, Coombs GH, Mottram JC 2003. Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. *Infect Immun* 71:3190-3195.
- Denise H, Poot J, Jiménez M, Ambit A, Herrmann DC, Vermeulen AN, Coombs GH, Mottram JC 2006. Studies on the CPA cysteine peptidase in the *Leishmania infantum* genome strain JPCM5. *BMC Mol Biol* 7:42.
- Donovan C 1903. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Br Med J* ii: 79.
- Duboise SM, Vannier-Santos MA, Costa-Pinto D, Rivas L, Pan AA, Traub-Cseko Y, De Souza W, McMahon-Pratt D 1994. The biosynthesis, processing, and immunolocalization of *Leishmania pifanoi* amastigote cysteine proteinases. *Mol Biochem Parasitol* 68:119-132.

- Felizardo TC, Toma LS, Borges NB, Lima GMCA, Abrahamsohn IA 2007. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection and dissemination in mice inoculated with stationary-phase or with purified metacyclic promastigotes. *Parasitol*. 134, 1699-1707.
- Frame MJ, Mottram JC, Coombs GH 2000. Analysis of the roles of cysteine proteinases of *Leishmania mexicana* in the host-parasite interaction. *Parasitol* 121:367-377.
- Franke ED, McGreevy PB, Katz SP, Sacks DL 1985. Growth cycle-dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes. *J Immunol* 134:2713-2718.
- Garg R, Dube A 2006. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis *Indian J Med Res* 123:439-454.
- Gomes IN, Calabrich AF, Tavares RS, Wietzerbin J, de Freitas LA, Veras OS 2003. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes Infect* 5:251-260.
- Gramiccia M, Gradoni L 2005. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 35:1169-80.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138.
- Guevara P, Pinto-Santíni D, Rojas A, Crisante G, Añez N, Ramirez JL 2001. Green fluorescent protein-tagged *Leishmania* in phlebotomine sand flies. *J Med Entomol* 38:39-43.
- Guimarães ET, Santos LA, Ribeiro dos Santos R, Teixeira MM, dos Santos WL, Soares MB 2006. Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. *Microbes Infect* 8:1219-1226.

- Handman E 1999. Cell Biology of Leishmania. *Adv Parasitol* 44:1-39
- Harding CV 1991. Pathways of antigen processing. *Curr Opin Immunol* 3:3-9.
- Hernández Sanabria MX, Afonso LC, Golgher D, Tafuri WL, Vieira LQ 2007. CD8+ T cells are not required for vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* in IL-12/23P40(-/-) C57BL/6 mice. *Microbes Infect* 9:1124-1134.
- Hernández-Ruiz J, Becker I 2006. Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la leishmaniasis cutánea. *Salud Publica Mex* 48:430-439.
- Herwaldt BL 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354:1191-1199.
- Herwaldt BL, Arana BA, Navin TR 1992. The natural history of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *J Infect Dis* 165:518-527.
- Hide M, Bañuls AL 2008. Polymorphisms of cpb multicopy genes in the *Leishmania (Leishmania) donovani* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102:105-106.
- Ji J, Masterson J, Sun J, Soong L 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol* 174:7147-7153.
- Ji J, Sun J, Qi H, Soong L 2002. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am J Trop Med Hyg* 66:338-345.
- Ji J, Sun J, Soong L 2003. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun* 71:4278-4288.
- Jones DE, Ackermann MR, Wille U, Hunter CA, Scott P 2002. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infect Immun* 70:2151-2158.

- Jones DE, Buxbaum LU, Scott P 2000. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol* 165:364-372.
- Julia V, Rassoulzadegan M, Glaichenhaus N 1996. Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science* 274:421-423.
- Juliano MA, Brooks DR, Selzer PM, Pandolfo HL, Judice WA, Juliano L, Meldal M, Sanderson SJ, Mottram JC, Coombs GH 2004. Differences in substrate specificities between cysteine protease CPB isoforms of *Leishmania mexicana* are mediated by a few amino acid changes. *Eur J Biochem* 271:3704-3714.
- Killick-Kendrick R 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 4:1-24.
- Kima PE, Constant SL, Hannum L, Colmenares M, Lee KS, Haberman AM, Shlomchik MJ, McMahon-Pratt D 2000. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 191:1063-1080.
- Lainson R 1996. New World leishmaniasis. P. 218-229. *In* The Wellcome Trust illustrated history of tropical diseases. Cox FEG. The Wellcome Trust, London, England.
- Lainson R 1997. Leishmania e leishmaniose com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Rev Paraense Med* 11: 29-40.
- Lainson R, Shaw JJ 1972. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *Brit Med Bull* 28:44-48.
- Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographic distribution. *In* The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Vol. 1, 1ª Edição. W Peters, R Killick-Kendrick. Academic Press, London, England.

- Lanfranco MF, Loayza-Muro R, Clark D, Núñez R, Zavaleta AI, Jimenez M, Meldal M, Coombs GH, Mottram JC, Izidoro M, Juliano MA, Juliano L, Arévalo J 2008. Expression and substrate specificity of a recombinant cysteine proteinase B of *Leishmania braziliensis*. *Mol Biochem Parasitol* 161:91-100.
- Lasakosvitsch F, Gentil LG, dos Santos MR, da Silveira JF, Barbiéri CL 2003. Cloning and characterisation of a cysteine proteinase gene expressed in amastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis*. *Int J Parasitol* 33:445-454.
- Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W 2008. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiol* 213:183-191.
- Laurenti MD, Gidlund M, Ura DM, Sinhorini IL, Corbett CE, Goto H 1999. The role of natural killer cells in the early period of infection in murine cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 32:323-325.
- Laurenti MD, Orn A, Sinhorini IL, Corbett CE 2004. The role of complement in the early phase of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in BALB/c mice. *Braz J Med Biol Res* 37:427-434.
- Laverian A, Mesnil P 1903. Sur un Protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani*, Lav. et Mesn.) parasite d'une fièvre de l'Inde. *C R Ac Sci* cxxxvii: 957-961.
- Leishman WB 1903. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Br Med J* i: 1252-1254.
- Lemos de Souza V, Ascensão Souza J, Correia Silva TM, Sampaio Tavares Veras P, Rodrigues-de-Freitas LA 2000. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes Infect* 2:1807-1815.
- Linares E, Augusto O, Barão SC, Giorgio S 2000. *Leishmania amazonensis* infection does not inhibit systemic nitric oxide levels elicited by lipopolysaccharide *in vivo*. *J Parasitol* 86:78-82.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lühe M 1906. Die in Blute schmarotzenden Protozoen und ilire nächsten Verwandten. *In* Handbuch der Tropenkrankheiten vol. 3, Mense CA. Barth JA Presse, Leipzig, Deutschland.
- Maia-Elkhoury AN, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA 2008. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica* 24:2941-2947.
- Maioli TU, Takane E, Arantes RM, Fietto JL, Afonso LC 2004. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. *Parasitol Res* 94:207-212.
- Marín-Villa M, Vargas-Inchaustegui DA, Chaves SP, Tempone AJ, Dutra JM, Soares MJ, Ueda-Nakamura T, Mendonça SC, Rossi-Bergmann B, Soong L, Traub-Csekö YM 2008. The C-terminal extension of *Leishmania pifanoi* amastigote-specific cysteine proteinase Lpcys2: a putative function in macrophage infection. *Mol Biochem Parasitol* 162:52-59.
- Marzochi MC, Marzochi KB 1994. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica* 10:359-375.
- Matlashewski G 2001. *Leishmania* infection and virulence. *Med Microbiol Immunol* 190:37-42.
- Matthews DJ, Emson CL, McKenzie GJ, Jolin HE, Blackwell JM, McKenzie AN 2000. IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. *J Immunol* 164:1458-1462.
- McMahon-Pratt D, Alexander J 2004. Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol Rev* 201:206-224.

- Migone LE 1913. Um caso de Kala-azar a Assuncion (Paraguay). *Bull Soc Path Exot* 6:118-120.
- Ministério da Saúde 2007. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª Edição Atualizada. Editora Ministério da Saúde. Brasília, Brasil.
- Moreira J 1895. Existe na Bahia o botão de Biskra. *Gaz Med Bahia* p. 254.
- Mottram JC, Brooks DR, Coombs GH 1998. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Curr Opin Microbiol* 1:455-460.
- Mottram JC, Coombs GH, Alexander J 2004. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr Opin Microbiol* 7:375-381.
- Mottram JC, Frame MJ, Brooks DR, Tetley L, Hutchison JE, Souza AE, Coombs GH 1997. The multiple cpb cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. *J Biol Chem* 272:14285-14293.
- Mottram JC, Robertson CD, Coombs GH, Barry JD 1992. A developmentally regulated cysteine proteinase gene of *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol* 6:1925-1932.
- Mukbel RM, Patten C Jr., Gibson K, Ghosh M, Petersen C, Jones DE 2007. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am J Trop Med Hyg* 76:69-675.
- Mundodi V, Kucknoor AS, Gedamu L 2005. Role of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition. *BMC Mol Biol* 6:3.
- Nakhaee A, Taheri T, Taghikhani M, Mohebbali M, Salmanian AH, Fasel N, Rafati S 2004. Humoral and cellular immune responses against Type I cysteine proteinase

of *Leishmania infantum* are higher in asymptomatic than symptomatic dogs selected from a naturally infected population. *Vet Parasitol* 119:107-123.

Neal RA, Hale C 1983. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniases. *Parasitol* 87:7-13.

Noyes HA 1998. Implications of a Neotropical Origin of the Genus *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93:657-662.

Noyes HA, Morrison DA, Chance ML, Ellis JT 2000. Evidence for a neotropical origin of *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95:575-578.

Nussbaum AK, Kuttler C, Hadelar KP, Rammensee HG, Schild H 2001. PAMProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW. *Immunogenetics* 53:87-94.

Nylén S, Sacks D 2007. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol* 28:378-384.

Ogata K, Wodak SJ 2002. Conserved water molecules in MHC class-I molecules and their putative structural and functional roles. *Protein Engineering* 15:697-705.

Oliveira CC, Lacerda HG, Martins DR, Barbosa JD, Monteiro GR, Queiroz JW, Sousa JM, Ximenes MF, Jeronimo SM 2004. Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. *Acta Trop* 90:155-162.

Omara-Opyene AL, Gedamu L 1997. Molecular cloning, characterization and overexpression of two distinct cysteine protease cDNAs from *Leishmania donovani chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* 90:247-267.

Organização Mundial de Saúde/OMS (World Health Organization/WHO) 2002. Leishmaniasis: burden of disease. [<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>].

Organização Mundial de Saúde/OMS (World Health Organization/WHO) 2009. Leishmaniasis: the global trend. [http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media_leishmaniasis/en/index.html].

Osorio y Fortéa J, de La Llave E, Regnault B, Coppée JY, Milon G, Lang T, Prina E 2009. Transcriptional signatures of BALB/c mouse macrophages housing multiplying *Leishmania amazonensis* amastigotes. *BMC Genomics* 10:119.

Oumeish OY 1999. Cutaneous leishmaniasis: a historical perspective. *Clin Dermatol* 17:249-254.

Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C 1999. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokines* 11:305-312.

Padigel UM, Alexander J, Farrell JP 2003. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *J Immunol* 171:3705-3710.

Pascalis H, Lavergne A, Bourreau E, Prévot-Linguet G, Kariminia A, Pradinaud R, Rafati S, Launois P 2003. Th1 cell development induced by cysteine proteinases A and B in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. *Infect Immun* 71:2924-2926.

Pereira BAS, Alves CR 2008. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Vet Parasitol* 158:239-255.

Pinheiro RO, Rossi-Bergmann B 2007. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57BL/6 mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:79-82.

Podlipaev S 2001. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. *Int J Parasitol* 31:648-652.

- Pollock KG, McNeil KS, Mottram JC, Lyons RE, Brewer JM, Scott P, Coombs GH, Alexander J 2003. The *Leishmania mexicana* cysteine protease, CPB2.8, induces potent Th2 responses. *J Immunol* 170:1746-1753.
- Pompeu ML, Freitas LA, Santos ML, Khouri M, Barral-Netto M 1991. Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. *Acta Trop* 48:185-193.
- Poot J, Denise H, Herrmann DC, Mottram JC, Coombs GH, Vermeulen AN 2006. Virulence and protective potential of several Cysteine peptidase knockout strains of *Leishmania infantum* in hamsters (chapter 5). In Experimental challenge models for canine leishmaniasis in hamsters and dogs, optimization and application in vaccine research (dissertation). Poot J. Utrecht University press. Utrecht, Netherlands.
- Prina E, Abdi SZ, Lebastard M, Perret E, Winter N, Antoine JC 2004. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *J Cell Sci* 117:315-325.
- Pulvertaft RJ, Hoyle GF 1960. Stages in the life-cycle of *Leishmania donovani*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 54:191-196.
- Qi H, Ji J, Wanasen N, Soong L 2004. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 72:988-995.
- Qi H, Popov V, Soong L 2001. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions *in vitro* and the priming of parasite-specific CD4(+) T cells *in vivo*. *J Immunol* 167:4534-4542.
- Ramer AE, Vanloubbeeck YF, Jones DE 2006. Antigen-responsive CD4+ T cells from C3H mice chronically infected with *Leishmania amazonensis* are impaired in the transition to an effector phenotype. *Infect Immun* 74:547-1554.

- Rebello KM, Côrtes LM, Pereira BA, Pascarelli BM, Côte-Real S, Finkelstein LC, Pinho RT, d'Avila-Levy CM, Alves CR 2009. Cysteine proteinases from promastigotes of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasitol Res* 106:95-104.
- Reiner SL, Locksley RM Annu 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Rev Immunol* 13:151-177..
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7:581-596.
- Riou G, Delain E 1969. Electron microscopy of the circular kinetoplastic DNA from *Trypanosoma cruzi*: occurrence of catenated forms. *Proc Natl Acad Sci USA* 62: 210-217.
- Robb RJ 1984. Interleukin 2: the molecule and its function. *Immunol Today* 5:203-209.
- Robertson CD, Coombs GH 1990. Characterisation of three groups of cysteine proteinases in the amastigotes of *Leishmania mexicana mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 42:269-276.
- Robertson CD, Coombs GH 1993. Cathepsin B-like cysteine proteases of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 62:271-279.
- Rognan D, Scapozza L, Folkers G, Daser A 1994. Molecular Dynamics Simulation of MHC-Peptide Complexes as a Tool for Predicting Potential T Cell Epitopes. *Biochemistry* 33: 11476–11485.
- Ross R 1903. Further notes on Leishman' bodies. *Br Med J* 2:1401.
- Sacks D, Anderson C 2004. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. *Immunol Rev* 201:225-238.

- Sacks D, Kamhawi S 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55:453-83.
- Sacks D, Noben-Trauth N 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2:845-858.
- Sakanari JA, Nadler SA, Chan VJ, Engel JC, Leptak C, Bouvier J 1997. *Leishmania major*: comparison of the cathepsin L- and B-like cysteine protease genes with those of other trypanosomatids. *Exp Parasitol* 85:63-76
- Sakthianandeswaren A, Foote SJ, Handman E 2009. The role of host genetics in leishmaniasis. *Trends Parasitol* 25:383-391.
- Saravia NG, Escorcía B, Osorio Y, Valderrama L, Brooks D, Arteaga L, Coombs G, Mottram J, Travi BL 2006. Pathogenicity and protective immunogenicity of cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana* in non-murine models. *Vaccine* 24:4247-4259.
- Selzer PM, Pingel S, Hsieh I, Ugele B, Chan VJ, Engel JC, Bogyo M, Russell DG, Sakanari JA, McKerrow JH 1999. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. *Proc Natl Acad Sci* 96:11015-11022.
- Sergent ED, Sergente ET, Parrot L, Donatien A, Bequet 1921. Transmission du clou de Biskra par Le phlébotome (*Phlebotomus papatasi* Scop). *Comp Rendu Acad Sci* 173: 1030-1032
- Silva EM, Bertho AL, Mendonça SC 1994. Effect of *in vivo* depletion of CD4+ T cells on experimental infection of susceptible BALB/c mice with *Leishmania amazonensis*. *Acta Trop* 56:111-120.
- Silveira FT, Lainson R, Corbett CE 2004. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99:239-251.

- Simpson AGB 2003. Cytoskeletal organization, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota). *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1759–1777.
- Simpson AGB, Lukes J, Roger AJ 2002. The Evolutionary History of Kinetoplastids and Their Kinetoplasts *Mol Biol Evol* 19:2071–2083.
- Simpson AGB, Stevens JR, Lukes J 2006. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol* 22:168-174
- Somanna A, Mundodi V, Gedamu L 2002. Functional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from *Leishmania donovani* complex. Evidence for the activation of latent transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 277:25305-25312.
- Soong L, Chang CH, Sun J, Longley BJ Jr, Ruddle NH, Flavell RA, McMahon-Pratt D 1997. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol* 158:5374-5383.
- Souza AE, Waugh S, Coombs GH, Mottram JC 1992. Characterization of a multi-copy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. *FEBS Lett* 311:124-127.
- Späth GF, Garraway LA, Turco SJ, Beverley SM 2003. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci EUA* 100:9536-9541.
- Splendore A 1911. Leishmaniosi com localizzazione nelle cavità mucose (Nuova forma clinica). *Bull Soc Path Exot* 5:411-438.
- Subash S, Rita M, Tim RM 1995. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 2:271-279.

- Tavares NM, Santos DM, Oliveira CI, Brodskyn CI 2009. Estratégias de vacinação contra leishmaniose visceral e cutânea: lições dos modelos experimentais. *Gazeta Médica da Bahia* 79:110-121.
- Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Barral-Netto M, Barral A 2006. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol* 22:32-40.
- Terabe M, Kuramochi T, Hatabu T, Ito M, Ueyama Y, Katakura K, Kawazu S, Onodera T, Matsumoto Y 1999. Non-ulcerative cutaneous lesion in immunodeficient mice with *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitol Int* 48:47-53.
- Terabe M, Kuramochi T, Ito M, Hatabu T, Sanjoba C, Chang KP, Onodera T, Matsumoto Y 2000. CD4(+) cells are indispensable for ulcer development in murine cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 68:4574-4577.
- Terabe M, Wakana S, Katakura K, Onodera T, Matsumoto Y, Ito M 2004. Influence of H2 complex and non-H2 genes on progression of cutaneous lesions in mice infected with *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Int* 53:217-221.
- Toyoshima S, Iwata M, Osawa T 1976. Kinetics of lymphocyte stimulation by concanavalin A. *Nature* 264:447-449.
- Traub-Cseko YM, Duboise M, Boukai LK, McMahon-Pratt D 1993. Identification of two distinct cysteine proteinase genes of *Leishmania pifanoi* axenic amastigotes using the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 57:101-115.
- Van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 173:6521-6525.
- Vanloubbeeck YF, Ramer AE, Jie F, Jones DE 2004. CD4+ Th1 cells induced by dendritic cell-based immunotherapy in mice chronically infected with *Leishmania amazonensis* do not promote healing. *Infect Immun* 72:4455-4463.

- Vasquez RE, Soong L 2006. CXCL10/gamma interferon-inducible protein 10-mediated protection against *Leishmania amazonensis* infection in mice. *Infect Immun* 74:6769–6777.
- Vasquez RE, Xin L, Soong L 2008. Effects of CXCL10 on dendritic cell and CD4+ T-cell functions during *Leishmania amazonensis* infection. *Infect Immun* 76:161-169.
- Vianna G 1911. Sobre uma nova espécie de *Leishmania*. *Bras Med* 25:411.
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W 1999. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68:1015-1068.
- Von Stebut E, Udey MC 2004. Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes Infect* 6:1102-9.
- Wanase N, Xin L, Soong L 2008. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *Int J Parasitol* 38:417-429.
- Watanabe Y, Hamaguchi-Tsuru E, Morimoto N, Nishio Y, Yagyu K, Konishi Y, Tominaga M, Miyazaki J, Furuya M, Tominaga A 2004. IL-5-induced eosinophils suppress the growth of *Leishmania amazonensis* *in vivo* and kill promastigotes *in vitro* in response to either IL-4 or IFN-gamma. *DNA Cell Biol* 23:412-418.
- Weinheber N, Wolfram M, Harbecke D, Aebischer T 1998. Phagocytosis of *Leishmania mexicana* amastigotes by macrophages leads to a sustained suppression of IL-12 production. *Eur J Immunol* 28:2467-2477.
- Wright JH 1903. Protozoa in a Case of Tropical Ulcer (“Delhi Sore”). *J Med Res* 10: 472–482.
- Xin L, Li K, Soong L 2008. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Mol Immunol* 45:3371-3382.

Xin L, Li Y, Soong L 2007. Role of Interleukin-1 β in Activating the CD11c^{high} CD45RB⁻ Dendritic Cell Subset and Priming *Leishmania amazonensis*-Specific CD4⁺ T Cells *In Vitro* and *In Vivo*. *Infect Immun* 75:5018-5026.

Yang Z, Mosser DM, Zhang X 2007. Activation of the MAPK, ERK following *Leishmania amazonensis* infection of macrophages. *J Immunol* 178:1077-1085.

Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Ortiz-Ortiz L 2002. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol* 18: 272-278.

ANEXOS

- **Artigo publicado em revista indexada**

Pereira BAS, Alves CR 2008. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Vet Parasitol* 158:239-255.

- **Artigos submetidos para publicação em revistas indexadas**

Pereira BAS, Britto C, Alves CR. Expression of infection-related genes in both host and parasites during the evolution of murine experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Submetido à *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (nº do processo: MIOC-2087).

Pereira BAS, Silva FS, Rebello KM, Marin-Villa M, Traub-Cseko, YM, Benévolo-de-Andrade TC, Bertho AL, Caffarena ER, Alves CR. *In silico* predicted epitopes from the COOH-terminal extension of cysteine proteinase B inducing distinct immune responses during *Leishmania (Leishmania) amazonensis* experimental murine infection. Submetido ao *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (nº do processo: JBB/313785)

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Veterinary Parasitology 158 (2008) 239–255

**veterinary
parasitology**

www.elsevier.com/locate/vetpar

Review

Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Bernardo Acácio Santini Pereira, Carlos Roberto Alves*

Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 20 June 2008; received in revised form 2 September 2008; accepted 8 September 2008

Abstract

The murine models of *Leishmania* infection are well-studied and suitable models for studying this disease, which, despite its incidence of nearly 2 million new cases worldwide per year and its prevalence of 12 million cases, has been a somewhat neglected disease. Data obtained using such models are important for a better understanding of the disease in humans due to similarities in physiology and the advantage provided by the uniform infection profile within each mouse strain. In this review, we focus on studies of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, a species that has been associated with infections exhibiting various clinical features in humans. Mainly, we point out and discuss reports on: the effects of variations of the inoculum (such as strain, site, and size) in the establishment and development of the infection; characteristics of the infection in distinct mouse strains; and, the effects and subversions of the infection on components of the host innate and adaptive immune responses. The results obtained in these studies show that *L. (L.) amazonensis* infection in mice presents some unique features and immunoregulatory mechanisms, making it an interesting model for obtaining further knowledge of potential drugs targets and immunotherapy in *Leishmania* infection.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Leishmania (L.) amazonensis*; Murine infection; Immunology

Contents

1. Introduction	240
2. Murine experimental infection model	241
2.1. Susceptibility × resistance in murine strains	241
2.2. Effects of initial inoculum features in disease development	241
2.3. Distinct disease outcomes	242
2.4. Influence of inoculation of promastigotes and amastigotes in the infection outcome	242
3. Innate immune response	243
3.1. Granulocytes	244
3.2. Macrophages	245
3.3. Dendritic cells	245

* Corresponding author. LABMOLDEN, IOC, Fiocruz. Av. Brasil 4365, CP 926, 21040-900, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel.: +55 21 38658153; fax: +55 21 25903495.

E-mail address: calves@ioc.fiocruz.br (C.R. Alves).

3.4.	Natural killer T cells	246
3.5.	Complement system	246
3.6.	Toll-like receptors	246
4.	Inflammatory mediators and other molecules.	246
4.1.	Leukotrienes	246
4.2.	Prostaglandins	246
4.3.	Insulin-like growth factor-1	247
4.4.	Platelet activator factor	247
4.5.	Adenosine	247
4.6.	Gluthatione	247
4.7.	Hipoxia-induced factor-1	247
5.	Adaptive immune response	247
5.1.	B cells and antibodies	247
5.2.	CD8+ T cells	248
5.3.	CD4+ T cells	248
5.4.	Th1/Th2 immune response	248
6.	Cytokines and chemokines (chemical inflammatory mediators)	249
6.1.	Interleukin-4	249
6.2.	Interleukin-10	249
6.3.	Interferon- γ	249
6.4.	Interleukin-12	250
6.5.	Chemokines	250
7.	Remarks and discussion	250
	Acknowledgement	252
	References	252

1. Introduction

Trypanosomatidae protozoa from the genus *Leishmania* are the causative agents of an array of pathologies with distinct clinical symptoms, commonly known as leishmaniasis, which can affect humans and animals. The sand fly, which is leishmaniasis vector, acquires the parasites during its blood meal on an infected mammal, and may infect additional hosts during subsequent feedings. Many mammals, such as rodents, canines, equines, monkeys, sloths and humans, may serve as a reservoir for *Leishmania* spp. (Gramiccia and Gradoni, 2005). Due to its ability to circulate among humans and animals that are commonly present in domiciliar or peridomiciliar areas, leishmaniasis has been considered as an important zoonosis.

While in the mammalian host, the parasite is found inside cells of the mononuclear phagocyte system, such as macrophages, but when ingested by the sand fly vector, it inhabits the midgut of the insect. These changes in environment are accompanied by morphological changes in the parasite: it presents a round-shaped form without a visible flagellum, designated amastigote, inside mammalian cells and a long-shaped form with an anterior flagellum, designated promastigote, in the insect gut (Bates and Rogers, 2004).

Leishmania infections in humans are usually divided into localized cutaneous leishmaniasis (LCL), diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), mucocutaneous leishmaniasis and visceral leishmaniasis. Specifically on the tegumentary manifestations, LCL typically presents as a nodule that undergoes progressive ulceration until becoming a characteristic lesion and may vary in severity and clinical appearance. This clinical manifestation has a tendency to self-cure, although the time necessary for a cure may fluctuate. In contrast, DCL is characterized by multiple non-ulcerative nodules that may spread to patient's whole body. DCL does not typically have a tendency to self-cure and it is difficult to treat (Reithinger et al., 2007).

Among the many *Leishmania* species already described causing human and animal leishmaniasis, the *Leishmania (Leishmania) amazonensis* parasite is an important etiological agent of human tegumentary leishmaniasis and presents a wide spectrum of clinical diseases (Barral et al., 1991). Recent findings indicate that *L. (L.) amazonensis* is increasing its geographical distribution in Brazil, accounting for unusual clinical presentations in new transmission areas (Azeredo-Coutinho et al., 2007). Additionally, it is interesting to underline that the human infection by *L. (L.) amazonensis* is an incidental interaction, as the main

mammal hosts present in the natural ecosystem of this parasite are wild rodent, as *Proechymis* spp. It is also noteworthy the lack of detectable cutaneous lesions in such rodents during the development of the parasites (Osorio y Fortéa et al., 2007), in opposition to the numerous clinical manifestations observed in the human disease.

The murine model of *Leishmania* infection has been widely used in many studies to better understand the life cycle, infection process and host–parasite relationships of *Leishmania*. This model is very advantageous since it allows for a high level of control over the characteristics of the infected host and the parasite, clarifying important aspects that may drive infection control strategies, such as immunotherapy and vaccination. In this review, we aim to summarize important immunological characteristics of murine *L. (L.) amazonensis* infection and discuss some aspects that we consider that have not yet been properly addressed in the existing literature. Evidences indicate an immunomodulation profile that integrates both Th1 and Th2 immunological responses with permanency of the infection. Data gathered here suggest that the severity of the infection is related to the mouse strain tested, although a clearly resistant phenotype has not been observed.

2. Murine experimental infection model

2.1. Susceptibility \times resistance in murine strains

There are many inbred or mutant strains of mice already available that allow for selection of interesting host features depending on the research objectives. The genetic differences and similarities among these strains account for the characteristic disease manifestations

that each of them presents. For example, it was suggested that H-2 complex genes could be related to the growth of the parasites in cutaneous lesions and, thus, it is expected for strains that share the same haplotype to present similar disease manifestations and immune responses during *Leishmania* infection. However, such direct relationship does not occur, as some non-H2 genes may play an even more potent role in lesion progression (Terabe et al., 2004). This observation underscores the importance of multiple factors in determining the outcome and characteristics of the infection (Table 1).

Therefore, the course of cutaneous lesions caused by *L. (L.) amazonensis* differs markedly among various inbred mouse strains. Thus, it is known that BALB/c mice are highly susceptible to the development of characteristic chronic lesions induced by *L. (L.) amazonensis* (Calabrese and Da Costa, 1992). Similarly, C57BL/10 mice develop chronic lesions with persistent parasite loads (Afonso and Scott, 1993). In contrast, C3H, C57BL/6, DBA, and CBA mice are less susceptible to infection with parasites of the *Leishmania (Leishmania) mexicana* group, at distinct levels, and present slow development of lesions, but a persistent parasite load (Barral et al., 1983; Neal and Hale, 1983; Afonso and Scott, 1993; Soong et al., 1997; Jones et al., 2002).

2.2. Effects of initial inoculum features in disease development

Besides the importance of mouse genetic background in defining both the progression and the outcome of *L. (L.) amazonensis* infection, there are additional factors that may also influence these features, such as inoculum size, inoculation site, the *Leishmania* strain used and its

Table 1
Effects of diverse initial features on the outcome of experimental *L. (L.) amazonensis* murine infection

Initial feature	Effects on infection outcome
Mouse strain ^a	BALB/c or C57BL/10—high susceptibility to infection C3H, DBA, CBA or C57BL/6—partial resistance to infection (in different levels)
Parasite inoculum size ^b	10 Parasites—few animals present lesions 100 Parasites—most animal present lesions >1000 Parasites—all animals present lesions
Parasite strain source ^c	Cutaneous or mucosal—ulcerative lesions, extensive tissue damage, many infected macrophages, metastases, rapid dissemination to spleen and high levels of anti-parasite Igs Visceral—small lesions, mononuclear infiltrate, late dissemination to spleen and low levels of anti-parasite Igs
Parasite evolutive stage	Stationary-phase promastigotes \times metacyclic promastigotes—similar patterns of infection evolution but with a longer lag-phase for metacyclic promastigotes

^a No mouse strain has been described as completely resistant to *L. (L.) amazonensis* infection.

^b Site of inoculation: ear dermis.

^c Isolated from human cases of leishmaniasis.

source of isolation (e.g., strains obtained from human cases with distinct clinical characteristics), as depicted in the following paragraphs.

A model to simulate natural long-term parasitism was already proposed, where low doses (10–1000) of *L. (L.) amazonensis* metacyclic promastigotes were inoculated into the BALB/c mice ear dermis. The results showed that the establishment of cutaneous lesions depended on the inoculum size. While lesions were rare in animals infected with only 10 parasites, most animals infected with 100 parasites and all the animals infected with 1000 parasites developed progressive lesions (Courret et al., 2003).

A correlation was observed between the initial inoculum and the progression of the lesions; however, a correlation could not be found between the parasitic load of an infection site at any given time and its lesion volume. This was observed in assays examining BALB/c, C57BL/6, or C57BL/10 mice infected by subcutaneous injection of 10^4 amastigotes isolated from a case of diffuse cutaneous *L. (L.) amazonensis* infection (Cupolilo et al., 2003). It is also possible that the immunological profile observed in the infection site may differ from that of the draining lymph nodes, as it has been described that parasite loads in *L. (L.) amazonensis*-infected BALB/c mice remained stable in the ear (infection site), but increased in the lymph nodes between 23 and 40 weeks post-inoculation of metacyclic promastigotes (Courret et al., 2003).

Concerning the inoculation of parasites isolated from distinct cases of human infections in mice, it was shown that *L. (L.) amazonensis* parasites isolated from cases of cutaneous or mucosal human leishmaniasis are able to promote ulcerating footpad lesions with parasite-loaded macrophages and extensive tissue destruction in BALB/c mice. In addition, the infection caused by these strains presented skin metastasis, rapid dissemination of the parasites to the spleen and high levels of circulating anti-*Leishmania* antibodies. On the other hand, BALB/c mice infected with strains isolated from visceral cases showed completely distinct clinical features: small footpad lesions with mononuclear cell infiltration, few infected macrophages, and granuloma formation. Additionally, the skin metastases were not present, the dissemination of parasites to the spleen was delayed and lower levels of anti-*Leishmania* immunoglobulin (Ig) G were observed (Almeida et al., 1996).

2.3. Distinct disease outcomes

Murine models to assess specific characteristics of leishmaniasis, such as lesion ulceration, metastasis or,

even, osteomyelitis, have already been proposed. Mice with severe combined immunodeficiency (SCID) (C.B-17/lcrJcl-*scid*) have been tested as a model to understand the mechanisms of ulceration in lesions caused by *Leishmania* based on the observations that, in some cases of human leishmaniasis in AIDS patients, the expected ulceration of skin lesions does not occur. Inoculation of *L. (L.) amazonensis* promastigotes in these animals leads to non-ulcerative cutaneous lesions, which is consistent with the clinical features observed in AIDS patients and implicates a role for immune system cells (B and T lymphocytes) in the formation of ulcers (Terabe et al., 1999).

A system for studying metastasis in murine leishmaniasis was proposed in which small cuts into the shaved rump of BALB/c infected with *L. (L.) amazonensis* were used to stimulate the sprouting of metastases. After limiting dilution analysis and comparison of traumatized and non-traumatized infected mice, it was found that the cuts led to faster metastases development and that the presence of parasites in an equivalent area could be detected sooner in traumatized animals (Bertho et al., 1994).

A model for the study of osteomyelitis in *L. (L.) amazonensis* infection has also been proposed to help elucidate how diffuse cutaneous leishmaniasis may affect bone tissue. It was observed that 90–120 days post-infection of BALB/c mice (through parasite inoculation in the hind paw), an inflammatory infiltrate could be seen in the bone marrow, and intra and extra-medullary macrophages displayed intense parasitism. Areas of bone necrosis and compromised cartilage were also observed. It is noteworthy that all *L. (L.) amazonensis* strains used were isolated from human cases of DLC. Therefore, it was possible to relate the inflammatory processes that occur during infection with bone destruction and compromising of joints (Costa et al., 2006).

2.4. Influence of inoculation of promastigotes and amastigotes in the infection outcome

Although the results of experimental assays conducted with either *L. (L.) amazonensis* promastigotes or amastigotes have aided our understanding of distinct infection features, such data must be carefully considered. In the natural infection, a mixture of infective and non-infective promastigotes, characterizing a heterogeneous population, is released into the mammalian host during the phlebotomine blood meal. This heterogeneity of parasites, which is not adequately reproduced in experimental infections, may be crucial

for the initial phases of infection, as the non-infective (procyclic) promastigotes, which are susceptible to many host immune factors including complement system factors, are killed, potentially releasing immunoregulatory antigens that alter the evolution of infection. Interestingly, experimental infection assays using either stationary-phase promastigotes or metacyclic promastigotes in the footpad of BALB/c or C57BL/6 mice showed that, although longer lag-phases were observed during infections with purified metacyclic promastigotes, the patterns of disease progression, cytokine production, and disease susceptibility were similar for all conditions tested (Felizardo et al., 2007).

It has also been reported that subsets of *Leishmania* populations can mimic apoptosis, exposing phosphatidylserine (PS) on their surfaces, and, thus, both facilitate macrophage invasion via PS receptors and inhibit NO production by stimulating transforming growth factor (TGF)- β and interleukin (IL)-10 expression (De Freitas Balanço et al., 2001). As a consequence, the data generated by infection assays using a homogeneous parasite population may not be

truly representative of the natural development of *Leishmania* infections.

In addition, the experimental infections initiated with amastigotes should be interpreted with caution, as they do not present all expected phases of natural infection development. It is important to bear in mind that amastigotes present an already adapted phenotype and express macromolecules adequate for intramacrophage life, in contrast to promastigotes, which undergo adaptive stress in order to adapt to their new environmental conditions (Alves et al., 2005).

3. Innate immune response

The roles of cellular [polymorphonuclear granulocyte, neutrophils, eosinophils, dendritic cells (DCs), natural killer (NK) cells and mononuclear phagocytic] and non-cellular [complement system and Toll-like receptors (TLR)] components of the innate immune systems during *L. (L.) amazonensis* infection have already been suggested, and it is clear that these microorganisms manage to evade some these protective mechanisms (Table 2).

Table 2

Immune-related components effects in *L. (L.) amazonensis* murine experimental infection

Component	Disease controlling effects	Disease exacerbating effects
Innate immune response components		
Granulocytes	Increased presence of eosinophils allows for better control over infection (parasite killing by hydrogen peroxide)	May act as a 'Trojan horse' carrying parasites
Macrophages	Kills parasites by NO and superoxide when stimulated by cytokines or other factors	Highly colonized by parasites in large communal vacuoles; May produce IL-10 and, thus, cause immunosuppression
Dendritic cells	Mature and activate when phagocytose antibodies-opsonized parasites; In resistant mice strains, produces IL-12 leading to a Th1 response	Phagocytose complement factor 3-opsonized or non-opsonized parasites but do not mature, thus may serve as parasites carriers; In susceptible mice strains, produce IL-4 leading to a Th2 response; May have the signaling vias subverted by amastigotes and, thus, be unable to trigger a Th1 response
Natural killer lymphocytes	Lyse parasites and enhance macrophage activity; important in the early stages of the infection	nd*
Complement system	Important to kill parasites (specially non-infective promastigotes) in the early stages of the infection	Complement factor 3-opsonized parasites are phagocytosed by DCs but do not stimulate their maturation or activation
Toll-like receptors	Toll-like receptor 4 seems to be related to infection control	nd*
Inflammatory mediators and other molecules		
Leukotrienes	LTB4 can increase the synthesis of NO by macrophages and, thus, enhance parasite killing; Resistant mice strains produce more LTB4 than susceptible strains	nd*
Prostaglandines	nd*	When PGE2 synthesis is inhibited, mice present smaller lesions and lower parasitic load

Table 2 (Continued)

Component	Disease controlling effects	Disease exacerbating effects
Insulin-like growth factor-I	nd*	Increases parasites numbers and intensity of inflammatory infiltrate; Induces parasites proliferation inside macrophages and reduces NO production
Platelet activator factor	Enhances NO production by macrophages and, thus, helps to control the infection; Absence or inhibition leads to larger lesions and increased parasitic load	nd*
Adenosine	nd*	May be generated by parasites through hydrolyze of extracellular AMP and, thus, suppress inflammatory response
Glutathione	May be related to reduction in the parasitic load in the lesion and in the draining lymphnode	nd*
Hipoxy induced factor 1	nd*	Has its production increased in infected macrophages and may aid in the survival of parasites
Adaptive immune response components		
Immunoglobulins	Immunoglobulin-opsonized parasites can activate DCs	Important in the maintenance of the infection; Mice without antibodies are refractory to leishmaniasis
B lymphocytes	nd*	In B lymphocytes depleted mice, lesions are smaller and infection development is slower than wild type animals; In susceptible mice strains, B lymphocytes proliferation is higher than T lymphocytes
CD4+ lymphocytes	May produce Th1 related cytokines	Described as related to lesion ulceration; Absence of CD4+ Lymphocytes is beneficial to infected mice; May produce Th2 related cytokines
CD8+ lymphocytes	Their effectors mechanisms (INF- γ and perforin) are necessary for an anti-parasite response; May produce Th1 (Tc1) related cytokines	In the absence of IL-12, seem to play a pro-infection role; May produce Th2 (Tc2) related cytokines
Cytokines and chemokines		
Interleukin-4	nd*	Inhibits INF- γ and IgG2a production
Interleukin-10	May control tissue injury in the beginning of the infection	Limits Th1 response in the acute stage of the infection; Related to T regulatory lymphocytes (imunesuppression)
Interferon- γ	Play an important role in the control of the infection in its later stages	May stimulate amastigotes replication inside macrophages
Interleukin-12	Important to infection resistance	nd*
Chemokines	CXCL10 induces macrophages to kill parasites and delay lesion development, stimulating the production of IL-12 by DCs and INF- γ by CD4+ lymphocytes; CXCL10 and CCL2 are related to reduction in the parasitic load and induction of NO production	nd*

nd*—Not described in the literature.

3.1. Granulocytes

A study in BALB/c mice infected with *L. (L.) amazonensis*, which were either previously immunized with solubilized antigen from stationary-phase promastigotes (partially resistant) or were naive (highly susceptible), generated important information about the role of granulocytes during the course of murine leishmaniasis. The kinetic of cellular migration to lesion tissues displayed a predominance of granulocytes during the early phase of infection, with eosinophils representing approximately 10% of the cells in the inflammatory infiltrate. Granulocyte migration to the peritoneal cavity was also proposed

to occur in both BALB/c and C57BL/6 mice (Pompeu et al., 1991).

Moreover, it was stated that, despite the high influx of granulocytes to the lesion and its possible role in the initial destruction of the parasites inoculated, this migration did not seem to have an important effect on the outcome of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection (Pompeu et al., 1991). In contrast, granulocytes have been described as 'trojan horses' during *L. (L.) major* infection, as they enter an apoptotic state after phagocytosing parasites, aiding invasion of macrophages and leading these cells to secrete anti-inflammatory molecules (Van Zandbergen et al., 2004; Laskay et al., 2008).

The influence of eosinophils as a supplementary protection strategy in *L. (L.) amazonensis* infection has also been proposed (Watanabe et al., 2004). In this approach, it was observed that IL-5 transgenic mice (C3H/HeN-TgN[IL-5]-Imeg), in which 50% of peripheral blood leukocytes are eosinophils, clearly demonstrate suppressed progression of the disease, after infection with *L. (L.) amazonensis*. Such resistance was also observed in BALB/c mice, which are highly susceptible to *L. (L.) amazonensis*, after expression plasmids for IL-4, IL-5, and interferon (IFN)- γ were transferred into muscle by *in vivo* electroporation one week before infection. It has been verified that the parasite is killed by IL-4- or IFN- γ -stimulated eosinophils and that most of the killing is inhibited by catalase, but not by the NO inhibitor L-N5-(1-iminoethyl)-ornithine, suggesting that hydrogen peroxide is responsible for parasite killing.

3.2. Macrophages

As in all other *Leishmania* spp. infections, the macrophages are colonized by the amastigote parasites, which multiply intracellularly until the cells are disrupted. But the higher capacity of *L. (L.) amazonensis* to infect macrophages seems to be one of the factors that allow this parasite to sustain infection in mice strains that are resistant to infection by other *Leishmania* species. Studies have described that the parasite burden in *L. (L.) amazonensis*-infected CBA/J macrophages, after 12 h of infection, was nearly twice that of *L. (L.) major*-infected ones. In addition, the former parasites were able to survive within macrophages activated by recombinant IFN- γ , while the latter were susceptible (Gomes et al., 2003). Furthermore, the characteristics of macrophage colonization by *L. (L.) amazonensis* diverge from what has been described for other *Leishmania* species: while *L. (L.) major* amastigotes remain in small individual vacuoles, *L. (L.) amazonensis* amastigotes cohabit in a large communal vacuole (Castro et al., 2006).

This parasite has been described as resistant to killing by macrophage-produced nitric oxide (NO), as the production of both NO and superoxide by these cells is necessary for efficient *L. (L.) amazonensis* amastigote elimination (Mukbel et al., 2007). Moreover, evidence suggests that *L. (L.) amazonensis* is capable of inhibiting macrophage NO production in a murine macrophage cell line: a reduction in NO production concurrent with diminished iNOS activity was observed in the infected cells *in vitro* (Balestieri et al., 2002). This effect was independent of IL-4, IL-10 or tumor necrosis factor

(TNF)- β activity and occurred post-transcriptionally, as iNOS mRNA levels were not reduced, but could be reversed by the presence of INF- γ . However, these results are inconsistent with *in vivo* effects, as systemic NO levels observed in BALB/c mice challenged with lipopolysaccharide presented no differences between naive or infected animals (Linares et al., 2000).

Macrophages can also play a role in disease exacerbation during the initial stages of infection by producing IL-10, a critical cytokine for determining host susceptibility to *Leishmania* spp. infection. It has been reported that lesion-derived amastigotes can activate mitogen-activated protein kinase, specifically extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2, in macrophages and, along with other inflammatory stimuli, induce these cells to produce IL-10. Opsonization of parasites with IgG is also required for maximal IL-10 production, as the binding of these molecules to Fc γ receptors on the macrophage surface contributes to ERK activation (Yang et al., 2007).

3.3. Dendritic cells

Dendritic cells have been examined with regard to their capacity to serve as *L. (L.) amazonensis* metacyclic promastigote or amastigote hosts. It was noted that DCs were able to phagocytose both morphological stages of the parasite independently of previous opsonization with complement C3 or specific antibodies, but only DCs that phagocytosed antibody-opsonized parasites entered the maturation process. Therefore, it can be concluded that colonization of DCs by non-opsonized *L. (L.) amazonensis* parasites is beneficial for the parasite, allowing for the establishment and amplification of infection before the onset of an adaptive immune response (Prina et al., 2004).

Another study compared the behavior of DCs towards amastigotes in two mouse strains with distinct levels of susceptibility to *L. (L.) amazonensis*: BALB/c and C3H/HeJ. Amastigotes were able to enter and activate DCs from both strains, but in the more resistant strain (C3H/HeJ), DCs responded by releasing IL-12 in a CD40-dependent fashion, whereas IL-4 production was increased in BALB/c DCs (Qi et al., 2001).

Promastigotes of *L. (L.) amazonensis* were shown to activate DCs from C57BL/6 mice in culture by increasing the expression of maturation markers on the cell surface, but to a lesser extent than *L. (L.) major* promastigotes, causing the cells to display a 'semi-activated' profile. Specifically, the parasite activated the CD11c^{high} CD45RB⁻ DC subset. This semiactivation status could be partially modified towards full activation

by addition of exogenous IL-1 β to the culture, as demonstrated by a significant increase in the capacity of the DCs to activate CD4⁺ T cells (Xin et al., 2007).

A study has also reported the ability of amastigotes to more effectively interfere with the activation process of DCs from C57BL/6 mice than promastigotes, as evidenced by lower expression of molecules associated with cell maturation (CD40 and CD83) and cytokines (IL-12p40 and IL-10), as well as a diminished capacity to prime CD4⁺ cells based on comparisons of DCs infected with each parasite evolutive form (Xin et al., 2008).

Interestingly, the same study described many innate signaling pathways in DCs that are also subverted by amastigotes, including decreased phosphorylation of the signal transducers and activator of transcription (STAT)-1, 2, and 3 and ERK 1/2, degradation of STAT3, and decreased expression of interferon regulatory factors (IRF)-1 and 8. As a consequence of the disruption of such pathways, the ability of DCs to help mount a Th1 response is impaired (Xin et al., 2008).

3.4. Natural killer T cells

The role of NK cells during the early period of *L. (L.) amazonensis* promastigote infection was suggested by NK cell depletion experiments (Laurenti et al., 1999). Experiments were conducted in BALB/c mice injected with 90Sr and subsequently infected with the parasite. The authors observed a drastic reduction in the cytotoxic activity of NK cells over spleen cells infected by *Leishmania* parasites, as well as an increase in parasite numbers in the skin lesions of the NK cell-depleted group. These observations suggest a direct role of NK cells during the early period of infection. More recently, IL-2-activated NK cells were observed to lyse *L. (L.) amazonensis* and influence the resistance of macrophages to this parasite during the early phase of infection (Aranha et al., 2005).

3.5. Complement system

The complement system plays a dubious role during *L. (L.) amazonensis* infection. Although some of its components may aid parasite entry into mononuclear phagocytic cells by opsonizing them, complement was shown to be important, during initial stages of infection, to control the number of parasites in the lesion. Using infected complement-depleted or non-depleted BALB/c mice, the authors were able to show that the complement-depleted animals demonstrated decreased inflammatory responses and increased parasite loads 7 days post-infection. These mice also presented a high

number of parasites in the inoculation site 30 days post-infection compared to non-depleted mice, which showed a C3 deposit in the inoculation site throughout the period of infection (Laurenti et al., 2004). Non-infective *Leishmania* promastigotes are also known to be highly sensitive to the complement activity *in vitro*, while infective (metacyclic) forms resist its action (Zambrano-Villa et al., 2002).

3.6. Toll-like receptors

Regarding the influence of TLRs on murine *L. (L.) amazonensis* infection, very little has been reported. Yet this class of pattern recognition receptors seemingly influences infection outcome, as it was reported that a high percentage (60%) of BALB/c mice injected with a TLR-4-specific stimulating adjuvant plus *L. (L.) amazonensis* antigens (either soluble or from membrane) prior to injection of promastigotes were able to control the infection (presenting no foot swelling and negative *Leishmania* culture). Additionally, injection of the adjuvant with antigens proved to be useful in infected mice, as 40% of these mice were able to control the infection after injection. This effect on infection control is related to cytokine regulation, as treated mice were shown to present higher levels of IFN- γ and suppressed production of IL-4 (Calvopina et al., 2006).

4. Inflammatory mediators and other molecules

A variety of factors may also influence the outcome of *L. (L.) amazonensis* infection in mice, such as inflammatory mediators, growth factors, coagulation factors, hormones, antioxidant molecules, transcription factors and, even, nucleosides (Table 2).

4.1. Leukotrienes

LTB₄, a leukotriene, was shown to have a protective role in the response to *L. (L.) amazonensis* infection, as it activated macrophages to kill parasites by increasing NO production. This lipid mediator also seems to be related to host resistance to the disease, as macrophages from the susceptible mouse strain BALB/c produce lower levels of this leukotriene than macrophages from a more resistant strain (C3H/HePAS), (Serezani et al., 2006).

4.2. Prostaglandins

Prostaglandin E2 (PGE2), another lipid mediator, was shown to be a susceptibility factor, as mice treated with a PGE2 synthesis inhibitor demonstrated smaller

lesions and lower parasitic loads than untreated mice (Guimarães et al., 2006).

4.3. Insulin-like growth factor-I

Insulin-like growth factor (IGF)-I, which is usually already present at the site of infection rather than being secreted in response to it, seems to be important in the establishment of disease. It was noted that the presence of IGF-I leads to an increase in the number of parasites at the infection site and promotes a more intense inflammatory infiltrate. More importantly, it favors parasite growth within macrophages, induces arginase expression, which is a key factor in *Leishmania* growth, and reduces NO levels and NO-synthase 2, suggesting that it may play a crucial role during the early phases of the infection (Gomes et al., 2000; Vendrame et al., 2007).

4.4. Platelet activator factor

Platelet activator factor (PAF), a component of the clotting system, has been associated with the ability of macrophages to control *L. (L.) amazonensis* infection. Treatment of infected macrophages with PAF was shown to induce the production of NO, resulting in enhanced parasite-killing capacity. The importance of this molecule in macrophage regulation was also shown by injection of a selective PAF antagonist into infected C57BL/6 mice, leading to increased lesion sizes and parasitic loads in the lymph nodes and spleen (Lonardoni et al., 2000). In addition, C57BL/6 mice depleted of PAF receptor are more susceptible to *L. (L.) amazonensis* infection, as evidenced by delayed upregulation of INF- γ expression and impaired expression of NO-synthase-2 (Santiago et al., 2006).

4.5. Adenosine

Adenosine is a nucleoside previously shown to present anti-inflammatory properties. This nucleoside may also be responsible for the inflammatory suppression observed in *L. (L.) amazonensis* infections. As this parasite presented higher capacity to hydrolyze extracellular AMP when compared to *Leishmania (Viannia) braziliensis*, and may use host AMP to produce adenosine and, consequently, downregulate the inflammatory process (Maioli et al., 2004).

4.6. Glutathione

Glutathione, an antioxidant molecule previously reported to play a role in *L. (L.) major* infections (Romão

et al., 1999), also seems to influence progression of *L. (L.) amazonensis* infection in BALB/c mice, as animals receiving an injection of glutathione supplement, and, thus, presenting augmented levels of this molecule, showed a lower parasite load in the lesion site and draining lymph node, although differences in lesion development were not observed (Monteiro et al., 2008).

4.7. Hypoxia-induced factor-1

The transcriptional protein hypoxia-induced factor (HIF)-1 has also been described to play a potential role, which could be advantageous to the parasite, during *L. (L.) amazonensis* infection. BALB/c mouse macrophages present an upregulated expression of one of this molecule's subunits (HIF-1 α) when infected with the parasite *in vitro* (while the other subunit is constitutively expressed) and the use of a HIF-1 α inhibitor in cultures reduced parasite survival (Degrossoli et al., 2007).

5. Adaptive immune response

In general, the adaptive response in mammals against infections occurs after presentation of antigens by macrophages and DCs via MHC class II to T cells. Moreover, these cells, along with other cell types, also express MHC class I molecules, leading to CD8+ T cells activation during infections. There is evidence that cysteine-proteinases in *L. (L.) amazonensis* inhibit antigen presentation by cleaving MHC class II molecules in the host parasitophorous vacuole (De Souza Leão et al., 1995), suggesting a potential immunoregulatory mechanism of the parasite and that the adaptive response can be conducted by MHC class I molecules during murine infection.

5.1. B cells and antibodies

Despite the extreme importance of T cell-mediated immune responses in defining the outcome of *L. (L.) amazonensis* infections, other components of the adaptive immune system have also been shown to influence disease outcome (Table 2). For example, circulating antibodies have been shown to be important for maintenance of the infection, as genetically modified mice with either functional or non-functional B cells, but no circulating antibodies (mIgM/JhD Tg and JhD, respectively) were refractory to *Leishmania* infection (Kima et al., 2000). The same was found for animals with antibodies lacking the common γ -chain (BALB/cByJMTacfBR-[KO]). One possible explanation for these observations may be that IgG-opsonized

parasites have been shown to more effectively induce IL-10 production by macrophages than non-opsonized parasites, and this cytokine could be related disease exacerbation (Yang et al., 2007).

Experimental *L. (L.) amazonensis* infection assays carried with JhD mice, which lack B cells, again showed that antibodies are related to disease exacerbation, and that B cells themselves can also be related to increased pathology of the infection, as these mice presented slower development of the disease and smaller lesions than wild type BALB/c mice. CD19+ B cells were also shown to be the main cell type that proliferates in the draining lymph nodes of infected BALB/c mice, to a much greater extent than CD4+ and CD8+ T cells, whereas all of these cells types proliferated in a comparable fashion in C3H mice. As a result, the proliferation of this cell type could be related to susceptibility to the infection. It is possible that B cells are causing this adverse effect during infection by priming CD4+ cells and inducing cell migration to the infection site (Wanasen et al., 2008).

5.2. CD8+ T cells

CD8+ T cells are the major component of the inflammatory infiltrate in the central nervous system of BALB/c or Swiss mice infected with *L. (L.) amazonensis* (Abreu-Silva et al., 2003). They are also the predominant lymphocyte type observed in *L. (L.) amazonensis*-infected BALB/c lymph nodes, although infected CBA lymph nodes showed equivalent numbers of CD4+ and CD8+ T-cell subsets (Alves et al., 2004). Therefore, the phenotype of the predominant T-cell subset observed in mice lymph nodes during infection seems to depend on the genetic background of the mouse strain. The protective role of CD8+ T cells in *L. (L.) amazonensis* infection has been proved in vaccination/challenge assays in association with depletion of T cell subsets, where the effector mechanisms of CD8+ T cells (INF- γ and perforin) were shown to be required for protective immune responses against the parasites (Colmenares et al., 2003). But CD8+ T cells have also been shown to increase the pathology of infection in C57BL/6 mice with deficient production of the p40 chain of IL-12/23, as CD8+ T cell-depleted mice showed milder inflammation, smaller lesions, and better tissue integrity (Hernández Sanabria et al., 2007). Thus, the effective role of this T cell subset during *L. (L.) amazonensis* infection seems to depend on its interaction with other immune components.

5.3. CD4+ T cells

The previously mentioned influence on lesion ulceration during *L. (L.) amazonensis* infection is an example of the importance of adaptive immune system cells in the outcome of the infection. The authors of this study proposed that CD4+ T cells are responsible for the ulceration observed when splenocytes are injected into infected C.B-17/lcrJcl-*scid* mice, which present SCID (Terabe et al., 2000). This effect was inhibited when the injected splenocytes were depleted of CD4+ T cells, but not when depleted of CD8+ or B220+ cells.

Furthermore, the absence of CD4+ T cells has been suggested be beneficial for host control over *L. (L.) amazonensis* infection, as BALB/c mice depleted of CD4+ T cells by monoclonal antibody treatment presented reduced lesion size and mortality, as well as a lower parasite load and metastasis rate (Silva et al., 1994).

5.4. Th1/Th2 immune response

The paradigm of Th1/Th2 responses (each one characterized by a specific profile of cytokines secreted by T cells) in murine *L. (L.) major* infections is an already well-established concept: the ability to mount a Th1-predominant response is a good prognosis for control of the infection, whereas a Th2-predominant response usually translates into exacerbation of the disease (Alexander and Bryson, 2005), although there are suggestions in the bibliography that other immune mechanisms (such as the regulatory activity of IL-10) may be responsible for disease exacerbation (Sacks and Noben-Trauth, 2002; Nylén and Sacks, 2007).

These distinct characteristics of each T helper response can be related to their immunomodulatory features: while a Th1 response directs the adaptive immune system against intracellular pathogens (such as *Leishmania* spp. that inhabits macrophages), a Th2 response directs the immune system against extracellular pathogens, promoting an antibody-based response that does not activate macrophages, and is, thus, ineffective against parasites residing within these cells.

The characterization of such well-defined roles for Th1 and Th2 responses is somewhat controversial for murine infections caused by *Leishmania* species from the *L. (L.) mexicana* complex, such as *L. (L.) amazonensis*. The ability to mount a Th1 response is still reported as a resistant phenotype, but the susceptible phenotype has been proposed to be due to different factors, such as: a Th2 predominant response

(Lemos de Souza et al., 2000), the absence of a Th1 response (Afonso and Scott, 1993), or a mixed Th1/Th2 response (Ji et al., 2002; Sacks and Noben-Trauth, 2002).

Finally, some studies have stated that a predominant Th1 phenotype of CD4+ T cells may not be at all indicative of protection against *L. (L.) amazonensis* infections (Vanloubbeek et al., 2004), once again showing that the Th1(resistance)/Th2(susceptibility) paradigm remains very unclear with regard to *L. (L.) mexicana* complex parasites.

6. Cytokines and chemokines (chemical inflammatory mediators)

Many studies have focused on specific cytokines or a combination of these cytokines as susceptibility or resistance factors to infection by *L. (L.) amazonensis* in mice (Table 2).

6.1. Interleukin-4

Cytokine IL-4, an important interleukin that promotes a Th2 response, was shown to be a susceptibility factor to *L. (L.) amazonensis* infection, as IL4-deficient BALB/c mice presented higher levels of IFN- γ and anti-*Leishmania* IgG2a antibodies two weeks after infection when compared to wild type mice (Guimarães et al., 2006). In contrast, some studies suggest that IL-4 may not be the predominant susceptibility factor, as its production diminishes 3 weeks after infection and IL-4-KO C57BL/6 mice or mice treated with IL-4 antibodies still develop non-healing lesions (Jones et al., 2000, 2002; Ji et al., 2003).

6.2. Interleukin-10

The importance of IL-10, another cytokine usually described as Th2-related, in susceptibility to infection remains unclear. Although important for limiting the Th1 response during the acute phase of murine *L. (L.) amazonensis* infection, this cytokine does not play a similar role during the chronic phase of the disease, as, in C57BL/6 mice, the Th1 response was downregulated at this later stage of disease, even in IL-10-deficient animals (Jones et al., 2002).

In addition, experiments with IL-10-deficient BALB/c mice demonstrated that these animals, although unable to control lesion progression, had increased IFN- γ and NO production and IL-12p40 and IL-12R β 2 mRNA expression when compared to wild type mice (Padigel et al., 2003). Interestingly, after treatment with

anti-IL-4 antibodies, the IL-10-deficient mice could effectively control infection and had fewer parasites in their lesions, proving that IL-10 (along with IL-4) modulates susceptibility by abrogating the development of a Th1 protective response.

IL-10 has been suggested to be mainly produced by regulatory T [CD4+ (or CD8+) CD25+] cells (T reg cells) rather than by Th2 cells during *Leishmania* infection in mice. Thus, exacerbation of the infection may not be due to the action of Th2 cells, but to another type of T lymphocyte (Sacks and Anderson, 2004). In fact, IL-10 production by T reg cells was observed during *L. (L.) amazonensis* infection in C57BL/6 mice, not as a susceptibility factor, but as a mechanism that inhibits tissue injury by the immune response during early stages of the infection, although this modulation is later surpassed by other T effector cells (Ji et al., 2005).

6.3. Interferon- γ

The Th1-associated cytokine IFN- γ is downregulated in lymph node cells of C57BL/6 mice infected with *L. (L.) amazonensis* when compared with those in *L. (V.) braziliensis*-infected mice (Maioli et al., 2004), suggesting a mechanism by which *L. (L.) amazonensis* parasites modulate the host immune system that differs from other *Leishmania* species and may be related to the ability of this parasite to infect a wider number of mice strains.

Moreover, assays carried out with INF- γ -deficient C57BL/6 mice showed that this cytokine does not play a critical role during the initial stages of infection, as disease development in these mice was similar to that observed for their wild-type counterparts. But after two months, the INF- γ -deficient mice lost control of lesion growth and demonstrated increased parasite burden and IL-4 production, while presenting lower levels of IL-12 and TNF- α . The association of these data suggests that INF- γ production is important for the establishment of a Th1 response during later stages of the infection (Pinheiro and Rossi-Bergmann, 2007).

Interestingly, an ambiguous role has been proposed for IFN- γ during *L. (L.) amazonensis* infection: it was unexpectedly observed that, when not coupled to other factors, IFN- γ enhances amastigotes replication within infected macrophages, although it also activates these cells to kill promastigotes (Qi et al., 2004). On the other hand, when other factors, such as lipopolysaccharides, that can act synergistically with IFN- γ to activate macrophages, were present, this cytokine was able to induce macrophages to limit parasite growth.

6.4. Interleukin-12

The expression of IL-12, an important pro-inflammatory cytokine related to the Th1 response, has been reported to be significantly reduced during *L. (L.) amazonensis* infection. IL-12 is down regulated in *L. (L.) amazonensis*-infected C3H mice, and its expression is associated with the presence of the pathogen and proven to be independent of IL-4 expression (Jones et al., 2000). In addition to the reduction in IL-12 expression, these mice were also unresponsive to exogenous IL-12. This feature resulted from a defect in IL-12 β 2 receptor mRNA expression, which may be regulated by the parasite in some unknown way. Curiously, the parasites also seem capable of inhibiting IL-12-dependent IFN- γ production in CD4+ T cells, as cells isolated from *L. (L.) amazonensis*-infected C3HeB/FeJ mice subjected to antigen stimulation *in vitro* in the presence of IL-12 produced only 10–15% of the IFN- γ produced by cells obtained from *L. (L.) major*-infected mice (Ramer et al., 2006).

6.5. Chemokines

Murine *L. (L.) amazonensis* infection can also be related to inhibition of the expression of chemokines or chemokine receptors such as: CC chemokine ligand 3 (CCL3)/macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1), CCL4-MIP-1 β , CCL5/RANTES, MIP-2; chemokine receptor-1 (CCR-1), CCR-2, and CCR-5 (Ji et al., 2003). This may indicate yet another parasite survival strategy, as it has already been shown that chemokines acting in synergy with cytokines can regulate the capacity of leukocytes to control infection by *Leishmania* species, either by directly killing the parasites or by inducing migration and activation of other cell types (Teixeira et al., 2006). For example, CXCL10 has been reported to induce leishmanicidal activity in murine macrophages and delay lesion development in C57BL/6 mice by increasing IL-12 expression in DCs and increasing IL-12 responsiveness and INF- γ production in CD4+ T cells (Vasquez and Soong, 2006; Vasquez et al., 2008). In addition, both CXCL10 and CCL2 can reduce parasite burden in a dose-dependent manner and induce NO production (Vasquez and Soong, 2006).

7. Remarks and discussion

The experimental murine model of *L. (L.) amazonensis* infection, although not completely similar, is able to mimic many physiological features of the human infections and allow a high degree of control of host

characteristics (Awasthi et al., 2004), thus been adequate to produce data that can be later used as base for understanding the human disease. Taken together, the data collected in this review show that *L. (L.) amazonensis* infection in mice has a particular set of characteristics regarding its interaction with the host immune system, making it a very interesting and important model for immunoregulation studies.

In spite of the artificiality of the infection methods in many experimental infection studies, we consider that this model is more adequate to represent the features in human leishmaniasis than models that attempt to fully recreate the status of the host/parasite interaction in the natural ecosystem. As mentioned previously, the interaction of *L. (L.) amazonensis* with its natural hosts (wild rodents) is usually characterized by the absence of cutaneous lesions (Osorio y Fortéa et al., 2007), which is not the case in the diverse clinical manifestations of leishmaniasis in humans currently described. So, the experimental model data seem to better represent the characteristics of some aspects of the human disease.

Due to the high complexity of the host/parasite interaction system, each experimental study can only focus on one or a few infection features. So, although a detailed literature survey was performed, data on the role of some important immunological-related factors, as some cytokines, specifically during murine *L. (L.) amazonensis* infection, were not found. However, information on some of these factors is already described for other *Leishmania* spp.

With regard to the role played by TNF- α during *L. (L.) amazonensis* infection, we can hypothesize that it acts as described for leishmaniasis in general, activating macrophages to kill parasites and stimulating B lymphocytes to produce IgG2a, along with IFN- γ , and, thus, leading to infection cure (Hernández-Ruiz and Becker, 2006). But this cytokine, produced by Th1 cells and macrophages, may still have an adverse effect for the host due to the possibility that, together with macrophage inflammatory protein (MIP), it activates infected Langerhan cells to migrate from the skin to the draining lymph node, thus, contributing to infection progression (Arnoldi and Moll, 1998). In addition, IL-1 β , which is produced by infected macrophages, may also synergize with MIP to affect the same response.

Another cytokine that may play an important role is IL-13, a Th2-related cytokine that, similar to IL-4, IL-5, and IL-6, promotes IgE production and regulates immediate hypersensitivity reaction (Matthews et al., 2000; Hernández-Ruiz and Becker, 2006). Although it has been shown that the main cytokine related to susceptibility to *L. (L.) mexicana* is IL-4 (which may

also be true for *L. (L.) amazonensis* susceptibility), IL-13 and IL-10 may play important complementary roles (Alexander and Bryson, 2005).

Remarkably, antigen-presenting cells (APCs) such as DCs or macrophages have been described as able to produce IL-10 (Awasthi et al., 2004; Brandonisio et al., 2004), an ability that may be used by the parasite to induce a Th2 response (Brandonisio et al., 2004). Curiously enough, evidences indicate that even Th1 cells may produce IL-10 as a mechanism of restraining their own actions during *L. (L.) major* infection (O'Garra and Vieira, 2007).

Furthermore, *Leishmania* has been described as capable of inhibiting macrophage production of IL-12, which may be yet another immunoregulatory mechanism used to inhibit the Th1 response (Denkers and Butcher, 2005), perhaps by inducing IL-10 expression (a known inhibitor of IL-12 production). This may also be true for DCs, which are the main source of IL-12 production at the beginning of *Leishmania* infection, as observed by the fact that DCs are not stimulated to mature or secrete IL-12 during *L. (L.) mexicana* infection (Brandonisio et al., 2004).

However, it has recently been described that IL-12, although playing a predominant role in Th1 response induction, is not the only cytokine involved in this stimulus, as other IL-12 family interleukins (IL-23 and IL-27) and pro-inflammatory cytokines (IL-18) also contribute to Th1 response induction and maintenance, and may be produced by DCs (Von Stebut and Udey, 2004). Therefore, the parasites may also have to modulate the production of these cytokines in order to efficiently inhibit the Th1 response.

Although not yet clearly proved, it is possible that the effects of TLR-4 on IL-4 and IFN- γ production may occur through an increase in IL-12 production by DCs or macrophages, as such effects can be elicited by this cytokine. In *L. (L.) major* infection, TLRs are essential for the development of a Th1 response, and may be involved in DC maturation in the presence of parasites (Brandonisio et al., 2004).

It is important to point out that although we have used the terms Th1 and Th2 response throughout the text to indicate the immune response during murine infection by *L. (L.) amazonensis*, as it is commonly used, we believe one can not yet ascertain whether the T lymphocytes producing the cytokines that lead to one immune response type or the other are T helper or T cytotoxic cells. Although CD4+ T cells represent the T-cell type classically related to cytokine production, T cytotoxic cells have been shown to also produce cytokines related to both responses (Hernández-Ruiz

and Becker, 2006; Subash et al., 1995). Moreover, the main T-lymphocyte type that proliferates in the presence of *L. (L.) amazonensis* total antigen (as well as some peptides derived from the COOH-terminal of this parasite cysteine proteinase B) is the CD8+ T cell, and this cell type has already been shown to be the predominating lymphocyte type observed in *L. (L.) amazonensis*-infected Balb/c mice, and its numbers are greatly increased in infected CBA mice (Alves et al., 2004).

Other observations such as the cleavage of MHC class II molecules by *L. (L.) amazonensis* amastigotes in macrophages, which may impair the activation of CD4+ T cells (De Souza Leão et al., 1995), and the presence of the COOH-terminal fragment of *L. (L.) amazonensis* cysteine proteinase B in the cytoplasm of macrophages (Alves et al., 2005), which are effective APCs, associated with the fact that molecules secreted by *L. (L.) amazonensis* can be processed by proteasomes (Hernández-Ruiz and Becker, 2006), may indicate why CD8+ T cell numbers are increased during *L. (L.) amazonensis* infection and support the possible role of CD8+ T cells in defining the type of immune response.

It is possible that the interaction of *L. (L.) amazonensis* with the distinct murine strains during infection remains similar and that the differences in susceptibility or resistance between strains may not be due to the absence of specific immune pathways, but rather to intrinsic characteristics of higher or lower expression of some genes among the strains.

Therefore, although it is possible to speculate that the outcome of experimental *L. (L.) amazonensis* infection in mice is determined by the balance of Th1 and Th2 cells, the parasite antigens involved in the induction of such T-cell responses during *L. (L.) amazonensis* infections have not yet been sufficiently described. Thus, this balance can be better understood by the use of purified *Leishmania* antigens and synthetic peptides from *Leishmania* molecules in experimental assays. For this reason, it is necessary to identify antigen epitopes specific for particular T-cell subsets using synthetic peptides, purified proteins, or soluble protein extracts from this parasite.

This issue was addressed by our group when we described potential peptides from the COOH-terminal region of cysteine-proteinase (Alves et al., 2001) and their influence on Th1/Th2 cell differentiation in *L. (L.) amazonensis*-infected mice (Alves et al., 2004). We have proposed that the nature of the T-cell response induced by this parasite may be influenced by differences in the levels of APCs between the two tested mouse strains (BALB/c and CBA), leading to

distinct co-stimulatory signals and, thus, differential T-cell polarization (Alves et al., 2004).

We suggest that the mouse strain phenotype may be insufficient to control infection by this parasite, and that the overload of immunomodulatory antigens during infection may direct the host to mount an ineffective immune response, as observed by the mixed pattern (Th1/Th2) of immune responses in these animals.

There are currently no clearly established susceptibility and resistance criteria for mouse strains infected with *L. (L.) amazonensis*, as the reported experimental infection assays were not conducted under standardized conditions: inoculum size, parasite evolutive form used and strain varied. Consequently, there is no solid data from which a comparison of susceptibility grades can be established. Thus far, all mouse strains used in *L. (L.) amazonensis* experimental infection assays have developed lesions at some point during the infection, highlighting the absence of a clearly resistant strain.

Acknowledgments

We thank Dr. Alda Maria da Cruz e Dr. Sérgio Coutinho Furtado de Mendonça for critical reading of the manuscript and excellent suggestions for improvement. This study was supported by PAPES IV/CNPq (400148/2006-4) and FAPERJ (E-26/111.482/2008). Dr. Carlos Roberto Alves is fellow of the CNPq Institution and Bernardo Acácio Santini Pereira, M.Sc. is a fellow student from FIOCRUZ/CAPES.

Conflict of interest

The authors do not have any financial or personal relationships that could in anyway bias the statements present in this manuscript.

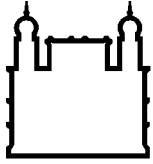
References

- Abreu-Silva, A.L., Calabrese, K.S., Tedesco, R.C., Mortara, R.A., Gonçalves da Costa, S.C., 2003. Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68, 661–665.
- Afonso, L.C., Scott, P., 1993. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.* 61, 2952–2959.
- Alexander, J., Bryson, K., 2005. T helper(h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol. Lett.* 99, 17–23.
- Almeida, R.P., Barral-Netto, M., De Jesus, A.M., De Freitas, L.A., Carvalho, E.M., Barral, A., 1996. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54, 178–184.
- Alves, C.R., Benevolo-De-Andrade, T.C., Alves, J.L., Pirmez, C., 2004. Th1 and Th2 immunological profile induced by cysteine proteinase in murine leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 26, 127–135.
- Alves, C.R., Corte-Real, S., Bourguignon, S.C., Chaves, C.S., Saraiva, E.M., 2005. *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation in vitro. *Exp. Parasitol.* 109, 38–48.
- Alves, C.R., Pontes de Carvalho, L.C., Souza, A.L., De Simone, S.G., 2001. A strategy for the identification of T-cell epitopes on *Leishmania* cysteine proteinases. *Cytobios* 104, 33–41.
- Aranha, F.C., Ribeiro Jr., U., Basse, P., Corbett, C.E., Laurenti, M.D., 2005. Interleukin-2-activated natural killer cells may have a direct role in the control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigote and macrophage infection. *Scand. J. Immunol.* 62, 334–341.
- Arnoldi, J., Moll, H., 1998. Langerhans cell migration in murine cutaneous leishmaniasis: regulation by tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and macrophage inflammatory protein-1 alpha. *Dev. Immunol.* 6, 3–11.
- Awasthi, A., Mathur, R.K., Saha, B., 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J. Med. Res.* 119, 238–258.
- Azeredo-Coutinho, R.G.B., Conceição-Silva, F., Schubach, A., Cupolillo, E., Quintella, R.P., Madeira, M.F., Pacheco, R.S., Valet-Rosalino, C.M., Mendonça, S.C.F., 2007. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 101, 735–737.
- Balestieri, F.M.P., Queiroz, A.R.P., Scavone, C., Costa, V.M.A., Barral-Netto, M., Abrahamsohn, I.A., 2002. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect.* 4, 23–29.
- Barral, A., Pedral-Sampaio, D., Grimaldi Junior, G., Momen, H., McMahon-Pratt, D., Ribeiro de Jesus, A., Almeida, R., Badaro, R., Barral-Netto, M., Carvalho, E.M., Johnson Jr., W.D., 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44, 536–546.
- Barral, A., Petersen, E.A., Sacks, D.L., Neva, F.A., 1983. Late metastatic leishmaniasis in the mouse. A model for mucocutaneous disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 277–285.
- Bates, P.A., Rogers, M.E., 2004. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr. Mol. Med.* 4, 601–609.
- Bertho, A.L., Santiago, M.A., Coutinho, S.G., 1994. An experimental model of the production of metastasis in murine cutaneous leishmaniasis. *J. Parasitol.* 80, 93–99.
- Brandonisio, O., Spinelli, R., Pepe, M., 2004. Dendritic cells in *Leishmania* infection. *Microbes Infect.* 6, 1402–1409.
- Calabrese, K.S., Da Costa, S.C., 1992. Enhancement of *Leishmania amazonensis* infection in BCG non-responder mice by BCG-antigen specific vaccine. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87, 49–56.
- Calvopina, M., Barroso, P.A., Marco, J.D., Korenaga, M., Cooper, P.J., Nonaka, S., Hashiguchi, Y., 2006. Efficacy of vaccination with a combination of *Leishmania* amastigote antigens and the lipid A-analogue ONO-4007 for immunoprophylaxis and immunotherapy against *Leishmania amazonensis* infection in a murine model of New World cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 24, 5645–5652.
- Castro, R., Scott, K., Jordan, T., Evans, B., Craig, J., Peters, E.L., Swiker, K., 2006. The ultrastructure of the parasitophorous vacuole formed by *Leishmania major*. *J. Parasitol.* 92, 1162–1170.
- Colmenares, M., Kima, P.E., Samoff, E., Soong, L., McMahon-Pratt, D., 2003. Perforin and gamma interferon are critical CD8+ T-

- cell-mediated responses in vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* infection. *Infect. Immun.* 71, 3172–3182.
- Costa, A.A., Abreu, A.L., Gomes, C.M., Saldanha, A.C., Barral, A., Costa, J.M., Corbett, C.E., 2006. Experimental model of chronic osteomyelitis caused by *Leishmania (L) amazonensis*. *Acta Trop.* 98, 125–129.
- Courret, N., Lang, T., Milon, G., Antoine, J.C., 2003. Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. *Int. J. Parasitol.* 33, 1373–1383.
- Cupolilo, S.M., Souza, C.S., Abreu-Silva, A.L., Calabrese, K.S., Goncalves da Costa, S.C., 2003. Biological behavior of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* isolated from a human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice. *Histol. Histo-pathol.* 18, 1059–1065.
- De Freitas Balanço, J.M., Moreira, M.E., Bonomo, A., Bozza, P.T., Amarante-Mendes, G., Pirmez, C., Barcinski, M.A., 2001. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite down-regulates macrophage microbicidal activity. *Curr. Biol.* 11, 1870–1873.
- De Souza Leão, S., Lang, T., Prina, E., Hellio, R., Antoine, J.C., 1995. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J. Cell Sci.* 108, 3219–3231.
- Degrossoli, A., Bosetto, M.C., Lima, C.B., Giorgio, S., 2007. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania amazonensis*. *Immunol. Lett.* 114, 119–125.
- Denkers, E.Y., Butcher, B.A., 2005. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends Parasitol.* 21, 35–41.
- Felizardo, T.C., Toma, L.S., Borges, N.B., Lima, G.M.C.A., Abrahamsohn, I.A., 2007. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection and dissemination in mice inoculated with stationary-phase or with purified metacyclic promastigotes. *Parasitology* 134, 1699–1707.
- Gomes, C.M., Goto, H., Ribeiro Da Matta, V.L., Laurenti, M.D., Gidlund, M., Corbett, C.E., 2000. Insulin-like growth factor (IGF)-I affects parasite growth and host cell migration in experimental cutaneous leishmaniasis. *Int. J. Exp. Pathol.* 81, 249–255.
- Gomes, I.N., Calabrich, A.F., Tavares Rda, S., Wietzerbin, J., de Freitas, L.A., Veras, O.S., 2003. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes Infect.* 5, 251–260.
- Gramiccia, M., Gradoni, L., 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* 35, 1169–1180.
- Guimarães, E.T., Santos, L.A., Ribeiro dos Santos, R., Teixeira, M.M., dos Santos, W.L., Soares, M.B., 2006. Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. *Microbes Infect.* 8, 1219–1226.
- Hernández Sanabria, M.X., Afonso, L.C., Golgher, D., Tafuri, W.L., Vieira, L.Q., 2007. CD8+ T cells are not required for vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* in IL-12/23P40(–/–) C57BL/6 mice. *Microbes Infect.* 9, 1124–1134.
- Hernández-Ruiz, J., Becker, I., 2006. Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la leishmaniasis cutánea. *Salud Publica Mex.* 48, 430–439.
- Ji, J., Masterson, J., Sun, J., Soong, L., 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.* 174, 7147–7153.
- Ji, J., Sun, J., Qi, H., Soong, L., 2002. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 338–345.
- Ji, J., Sun, J., Soong, L., 2003. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.* 71, 4278–4288.
- Jones, D.E., Ackermann, M.R., Wille, U., Hunter, C.A., Scott, P., 2002. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infect. Immun.* 70, 2151–2158.
- Jones, D.E., Buxbaum, L.U., Scott, P., 2000. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.* 165, 364–372.
- Kima, P.E., Constant, S.L., Hannum, L., Colmenares, M., Lee, K.S., Haberman, A.M., Shlomchik, M.J., McMahon-Pratt, D., 2000. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 191, 1063–1080.
- Laskay, T., van Zandbergen, G., Solbach, W., 2008. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology* 213, 183–191.
- Laurenti, M.D., Gidlund, M., Ura, D.M., Sinhorini, I.L., Corbett, C.E., Goto, H., 1999. The role of natural killer cells in the early period of infection in murine cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 323–325.
- Laurenti, M.D., Orn, A., Sinhorini, I.L., Corbett, C.E., 2004. The role of complement in the early phase of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in BALB/c mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 427–434.
- Lemos de Souza, V., Ascensão Souza, J., Correia Silva, T.M., Sampaio Tavares Veras, P., Rodrigues-de-Freitas, L.A., 2000. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes Infect.* 2, 1807–1815.
- Linares, E., Augusto, O., Barão, S.C., Giorgio, S., 2000. *Leishmania amazonensis* infection does not inhibit systemic nitric oxide levels elicited by lipopolysaccharide in vivo. *J. Parasitol.* 86, 78–82.
- Lonardoní, M.V., Russo, M., Jancar, S., 2000. Essential role of platelet-activating factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect. Immun.* 68, 6355–6361.
- Maioli, T.U., Takane, E., Arantes, R.M., Fietto, J.L., Afonso, L.C., 2004. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. *Parasitol. Res.* 94, 207–212.
- Matthews, D.J., Emson, C.L., McKenzie, G.J., Jolin, H.E., Blackwell, J.M., McKenzie, A.N., 2000. IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. *J. Immunol.* 164, 1458–1462.
- Monteiro, M.C., Marques, F.C., Blazius, R.D., Santos da Silva, O., de Queiroz Cunha, F., Bento, D.B., Torres Romão, P.R., 2008. *N*-Acetyl-L-cysteine reduces the parasitism of BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. *Parasitol. Res.* 102, 801–803.
- Mukbel, R.M., Patten Jr., C., Gibson, K., Ghosh, M., Petersen, C., Jones, D.E., 2007. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 669–675.

- Neal, R.A., Hale, C., 1983. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniasis. *Parasitology* 87, 7–13.
- Nylén, S., Sacks, D., 2007. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol.* 28, 378–384.
- O'Garra, A., Vieira, P., 2007. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 425–428.
- Osorio y Fortéa, J., Prina, E., de La Llave, E., Lecoeur, H., Lang, T., Milon, G., 2007. Unveiling pathways used by *Leishmania amazonensis* amastigotes to subvert macrophage function. *Immunol. Rev.* 219, 66–74.
- Padigel, U.M., Alexander, J., Farrell, J.P., 2003. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *J. Immunol.* 171, 3705–3710.
- Pinheiro, R.O., Rossi-Bergmann, B., 2007. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57Bl/6 mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 79–82.
- Pompeu, M.L., Freitas, L.A., Santos, M.L., Khouri, M., Barral-Netto, M., 1991. Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. *Acta Trop.* 48, 185–193.
- Prina, E., Abdi, S.Z., Lebastard, M., Perret, E., Winter, N., Antoine, J.C., 2004. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *J. Cell Sci.* 117, 315–325.
- Qi, H., Ji, J., Wanassen, N., Soong, L., 2004. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* 72, 988–995.
- Qi, H., Popov, V., Soong, L., 2001. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions *in vitro* and the priming of parasite-specific CD4(+) T cells *in vivo*. *J. Immunol.* 167, 4534–4542.
- Ramer, A.E., Vanloubbeeck, Y.F., Jones, D.E., 2006. Antigen-responsive CD4+ T cells from C3H mice chronically infected with *Leishmania amazonensis* are impaired in the transition to an effector phenotype. *Infect. Immun.* 74, 1547–1554.
- Reithinger, R., Dujardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S., 2007. Cutaneous Leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* 7, 581–596.
- Romão, P.R., Fonseca, S.G., Hothersall, J.S., Noronha-Dutra, A.A., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 1999. Glutathione protects macrophages and *Leishmania major* against nitric oxide-mediated cytotoxicity. *Parasitology* 118, 559–566.
- Sacks, D., Anderson, C., 2004. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. *Immunol. Rev.* 201, 225–238.
- Sacks, D., Noben-Trauth, N., 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 845–858.
- Santiago, H.C., Braga Pires, M.F., Souza, D.G., Roffê, E., Côrtes, D.F., Tafuri, W.L., Teixeira, M.M., Vieira, L.Q., 2006. Platelet activating factor receptor-deficient mice present delayed interferon-gamma upregulation and high susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Microbes Infect.* 8, 2569–2577.
- Serezani, C.H., Perrela, J.H., Russo, M., Peters-Golden, M., Jancar, S., 2006. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *J. Immunol.* 177, 3201–3208.
- Silva, E.M., Bertho, A.L., Mendonça, S.C., 1994. Effect of *in vivo* depletion of CD4+ T cells on experimental infection of susceptible BALB/c mice with *Leishmania amazonensis*. *Acta Trop.* 56, 111–120.
- Soong, L., Chang, C.H., Sun, J., Longley Jr., B.J., Ruddle, N.H., Flavell, R.A., McMahon-Pratt, D., 1997. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.* 158, 5374–5383.
- Subash, S., Rita, M., Tim, R.M., 1995. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 2, 271–279.
- Teixeira, M.J., Teixeira, C.R., Andrade, B.B., Barral-Netto, M., Barral, A., 2006. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 22, 32–40.
- Terabe, M., Kuramochi, T., Hatabu, T., Ito, M., Ueyama, Y., Katakura, K., Kawazu, S., Onodera, T., Matsumoto, Y., 1999. Non-ulcerative cutaneous lesion in immunodeficient mice with *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitol. Int.* 48, 47–53.
- Terabe, M., Kuramochi, T., Ito, M., Hatabu, T., Sanjoba, C., Chang, K.P., Onodera, T., Matsumoto, Y., 2000. CD4(+) cells are indispensable for ulcer development in murine cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* 68, 4574–4577.
- Terabe, M., Wakana, S., Katakura, K., Onodera, T., Matsumoto, Y., Ito, M., 2004. Influence of H2 complex and non-H2 genes on progression of cutaneous lesions in mice infected with *Leishmania amazonensis*. *Parasitol. Int.* 53, 217–221.
- Van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., Laskay, T., 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J. Immunol.* 173, 6521–6525.
- Vasquez, R.E., Soong, L., 2006. CXCL10/gamma interferon-inducible protein 10-mediated protection against *Leishmania amazonensis* infection in mice. *Infect. Immun.* 74, 6769–6777.
- Vasquez, R.E., Xin, L., Soong, L., 2008. Effects of CXCL10 on dendritic cell and CD4+ T-cell functions during *Leishmania amazonensis* infection. *Infect. Immun.* 76, 161–169.
- Vanloubbeeck, Y.F., Ramer, A.E., Jie, F., Jones, D.E., 2004. CD4+ Th1 cells induced by dendritic cell-based immunotherapy in mice chronically infected with *Leishmania amazonensis* do not promote healing. *Infect. Immun.* 72, 4455–4463.
- Vendrame, C.M., Carvalho, M.D., Rios, F.J., Manuli, E.R., Petitto-Assis, F., Goto, H., 2007. Effect of insulin-like growth factor-I on *Leishmania amazonensis* promastigote arginase activation and reciprocal inhibition of NOS2 pathway in macrophage *in vitro*. *Scand. J. Immunol.* 66, 287–296.
- Von Stebut, E., Udey, M.C., 2004. Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes Infect.* 6, 1102–1109.
- Wanassen, N., Xin, L., Soong, L., 2008. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *Int. J. Parasitol.* 38, 417–429.
- Watanabe, Y., Hamaguchi-Tsuru, E., Morimoto, N., Nishio, Y., Yagyu, K., Konishi, Y., Tominaga, M., Miyazaki, J., Furuya, M., Tomimaga, A., 2004. IL-5-induced eosinophils suppress the growth of *Leishmania amazonensis in vivo* and kill promastigotes *in vitro* in response to either IL-4 or IFN-gamma. *DNA Cell Biol.* 23, 412–418.

- Xin, L., Li, Y., Soong, L., 2007. Role of interleukin-1 β in activating the CD11c^{high} CD45RB⁻ dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*-specific CD4⁺ T cells *in vitro* and *in vivo*. *Infect. Immun.* 75, 5018–5026.
- Xin, L., Li, K., Soong, L., 2008. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Mol. Immunol.* 45, 3371–3382.
- Yang, Z., Mosser, D.M., Zhang, X., 2007. Activation of the MAPK. ERK following *Leishmania amazonensis* infection of macrophages. *J. Immunol.* 178, 1077–1085.
- Zambrano-Villa, S., Rosales-Borjas, D., Carrero, J.C., Ortiz-Ortiz, L., 2002. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol.* 18, 272–278.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

To
Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira

Editorial Office
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

March, 23rd 2010

Dear Dr. Oliveira

We are submitting the manuscript entitled “Expression of infection-related genes in both host and parasites during the evolution of murine experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*”, to be evaluated by the Editorial Board of Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. The manuscript proposes a study of the expression of infection-related genes in both hosts and parasites during experimental infection of mice. We assess the gene expression of *L. (L.) amazonensis* enzymes that are related to the infection process (CPB and CPC) and hosts’ MHC class I and MHC class II molecules (Balb/C and CBA mouse strains) using real-time polymerase chain reaction (PCR) assays. The manuscript was previously edited for proper English language by American Journal Express (1299 - 35F5 - A307 - E1BF – B309).

Best regards,

Dr Carlos Roberto Alves



www.journalexperts.com

American Journal Experts Editorial Certification

This document certifies that the manuscript titled "Expression of infection-related genes from both host and parasite during the evolution of murine experimental infection with Leishmania (Leishmania) amazonensis" was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process.

Documents receiving this certification should be English-ready for publication - however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns over this edited document, please contact American Journal Experts at support@journalexperts.com

Manuscript title: Expression of infection-related genes from both host and parasite during the evolution of murine experimental infection with Leishmania (Leishmania) amazonensis

Authors: Pereira, B.A.S., Britto, C. and Alves, C.R.

Key: 1299-35F5-A307-E1BF-B309

This certificate may be verified at www.journalexperts.com/certificate

American Journal Experts is an association of Ph.Ds and Ph.D. graduate students from America's top 10 research universities. Our editors come from nearly every research field and possess the highest qualifications to edit research manuscripts written by non-native English speakers. We provide the quickest turnaround times at the lowest prices in the industry. For more information, please visit www.journalexperts.com, or for volume discounts for academic journals, please contact us by email at sales@journalexperts.com

Dr.(a)Carlos Roberto Alves:

Manuscript: "Expression of infection-related genes in both host and parasites during the evolution of murine experimental infection with Leishmania (Leishmania) amazonensis."

Thank you for your above-mentioned manuscript which you kindly submitted for publication in the Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.

The manuscript will be sent to the Editorial Board for review. We will contact you again as soon as we receive the reviewer's comments.

With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site:

Thank you for considering this journal as a venue for your work.

Sincerely Yours,

Ricardo Lourenco de Oliveira
Editor

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz
<http://memorias.ioc.fiocruz.br>

Dear Dr(a)., Carlos, Alves:

We hereby inform you that the article below submitted to Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, includes your name in the author list.

Article: "MIOC-2087 - Expression of infection-related genes in both host and parasites during the evolution of murine experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*."

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz

<http://memorias.ioc.fiocruz.br>

Running Title: genes in mice infection by *L.amazonensis*

Title: Expression of infection-related genes in both host and parasites during the evolution of murine experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Authors: Pereira, B.A.S., Britto, C. and Alves, C.R.*

Institutional Affiliations and Address: Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz; Pavilhão Leonidas Deane, Avenida Brasil, 4365 sl. 209 Manguinhos Rio de Janeiro/RJ Brasil CEP: 21040-900 ; tel: +55 21 3865 8191; fax: +55 21 2590 3495; calves@ioc.fiocruz.br

SUMMARY

Leishmaniasis is an important zoonosis, affecting millions of people worldwide. An interesting feature of *Leishmania* parasites, is their ability to interfere with host immune responses, such as the T-cell responses, as observed in murine experimental infections. The distinct types of responses can lead to either to infection cure or exacerbation. In this study, we analyzed genes expression, in both host and parasite, during the progression of infection. Host's MHC classes I and II genes, as well as parasites' cysteine-proteinases B and C genes were examined in mice infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Our results show that murine strains with distinct levels of susceptibility to infection present different patterns of MHC gene expression. MHC class I genes have higher expression levels in CBA mice, whereas expression of MHC class II genes predominates in

Balb/C mice. In addition, the expression of cysteine-proteinase B genes by the parasites was shown to predominate over cysteine-proteinase C genes. We propose that studying the expression of infection-related genes in both hosts and parasites may lead to a clearer picture of the interactions that occur during experimental infection of mice and may lead to new and more efficient concepts for leishmaniasis treatment.

KEYWORDS

Leishmania (Leishmania) amazonensis; real-time PCR; major histocompatibility complex; cysteine-proteinase; murine experimental infection

INTRODUCTION

Despite its relevance worldwide, with a prevalence of 12 million affected people and an estimated incidence rate of 2 million new cases per year (Alvar et al., 2008), leishmaniasis has remained a neglected tropical disease (Lindoso & Lindoso, 2009). Currently, the importance of this disease is growing, as it has been expanding its geographical distribution since the beginning of the 1990's (Marzochi & Marzochi, 1994; Reithinger et al., 2007).

As a result, information regarding the many aspects of *Leishmania* infections, such as virulence factors, parasite life cycles or host-parasite interactions, is necessary because it may lead to the development of new chemotherapies or strategies for the control of disease transmission.

Although it is referred to as a single disease, leishmaniasis is, in fact, a collection of many distinct diseases (each bearing its own characteristic clinical features), which are caused by

different species of the *Leishmania* genus. In general, leishmaniasis is classified as localized cutaneous, diffuse cutaneous, mucosal or visceral, but even within these groups the aspects of the infection may be different, depending on the species of parasite causing the infection (Reithinger et al., 2007).

Leishmania infections typically begin during a blood meal of an infected sand fly (genus *Phlebotomus* in Africa and Asia and genus *Lutzomyia* in the Americas), which releases promastigotes into the host bloodstream. Eventually, they invade host cells (mainly mononuclear phagocytic system cells) and develop into amastigotes. The infection cycle is completed when cells containing amastigotes are taken up by other sand flies during subsequent blood meals.

An important characteristic of *Leishmania* infection is the ability of these parasites to control the hosts' immune responses on a number of levels (Pereira & Alves, 2008). In the murine model of experimental infection with *Leishmania (Leishmania) major*, an aspect of the immune system that is of pivotal importance in the establishment of infection is the T helper cell (types 1 (Th1) and 2 (Th2)) response. It has been reported that in susceptible murine strains, such as the Balb/C strain, the Th2 response is prevalent and is associated with disease exacerbation, whereas in resistant strains, such as the C57BL/6 strain, a preponderant Th1 response does restrain the infection (Alexander and Bryson, 2005). In addition, a cytotoxic T cell (Tc) response has been shown to correlate with infection control in mice (Ruiz & Becker, 2007).

Despite the fact that the roles of Th responses are not well defined in murine infections with *Leishmania* species from the *Leishmania (Leishmania) mexicana* complex (Pereira & Alves, 2008), many mechanisms have been reported in these species that either induce a

Th2 response or inhibit a Th1 response, revealing the fine level of control that the parasites have over the host immune system.

For example, a cysteine-proteinase (CP) from *L. (L.) mexicana*, designated cysteine-proteinase B (CPB), has been reported to modify the balance between the two Th responses, favoring a Th2 response (Mottram et al., 2004). *L. (L.) mexicana* mutants that lacked CPB production were not able to induce interleukin (IL)-4 expression in infected Balb/C mice and, thus, failed to stimulate a Th2 response and establish infection (Alexander et al., 1998). It was postulated that CPB may be involved in the degradation of the nuclear transcription factor κ B (NF κ B), as well as inhibitory NF κ B α and β , thereby inhibiting IL-12 production and the Th1 response (Cameron et al., 2004).

CPB belongs to the same group as two of the other well studied CPs in *Leishmania*, CPA and CPC. CPB is classified into Clan CA, Family C1. Like CPA, CPB is a cathepsin-L-like CP; however, CPB possesses some characteristics that set it apart from other CPs. For example, it contains a COOH-terminal extension of approximately 100 amino acids, which is cleaved for the enzyme to achieve its mature, active form. In addition, it exists as multiple isoenzymes (the genes of which are organized in a tandem array) (Mottram et al., 2004).

The COOH-terminal extension of CPB may play a role in the regulation of the host's Th responses to parasites. Our group has previously published a report defining peptides derived from the COOH-terminal of CPB with features that suggest that they may act as epitopes for murine major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. One of these peptides was able to affect the production of cytokines and lymphocyte types in cultured cells obtained from the lymph nodes of mice infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. The peptide induced a predominant Th2 response in cells from

a susceptible strain (Balb/C) and a mixed Th1/Th2 response in cells from a moderately resistant strain (CBA) (Alves et al., 2004).

Yet, in spite of the importance of CPs, such as CPB (and possibly others, including CPA and CPC), in mediating infection by species of the *L. (L.) mexicana* complex, no data is available regarding the levels of CPB genes expression during infections.

Similarly, the levels of MHC class I and II genes have not been defined in the host during the process of infection. MHC class I and II expression patterns are related to the type of lymphocyte response that will predominate and, thus, play a major role in the evolution of the infection.

Therefore, in the present study, we propose a strategy to assess gene expression levels of *L. (L.) amazonensis* enzymes that are related to the infection process (CPB and CPC) and levels of host (Balb/C and CBA mouse strains) molecules related to the T cell immune response (MHC class I and MHC class II molecules) using real-time polymerase chain reaction (PCR) assays.

MATERIALS AND METHODS

Cultivation of parasites

L. (L.) amazonensis MHOM/BR/77/LTB0016 strain promastigotes (obtained from Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz CLIOC/IOC - Fiocruz) were grown in Schneider medium (Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum for 4 days at 28 °C. For use in experimental infections, parasites were washed 3x with 50 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) centrifuged at 2,000 x g for 10 minutes at 4 °C, counted using a Neubauer chamber and suspended in PBS at a concentration of 2×10^7 cells/mL.

Experimental murine infection

Specific, pathogen-free female 5-7 week old mice (strains Balb/C and CBA) were obtained from the animal care facility of Fiocruz (Centro de Criação de Animais de Laboratório – CECAL/Fiocruz). Each animal was inoculated subcutaneously with 1×10^6 log-phase promastigotes in PBS (50 μ L) at its posterior left hindpaw. Lesion development was monitored using a pachymeter in three random animals of each strain. Hindpaw width and height were used to estimate lesion area (mm^2). Every two weeks, two animals were euthanized in CO₂ chambers and samples from the inoculation site (hindpaw), and its draining lymph node were collected, homogenized in Trizol reagent (Invitrogen) and stored at -70 °C. All procedures using animals were approved by the Animal Ethics Committee of Fiocruz (Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Fiocruz; L-0006/07).

Total RNA extraction

Total RNA from mouse hindpaw and lymph node samples was extracted using Trizol, according to manufacturer's instructions. Briefly, insoluble material was removed by centrifugation (12,000 xg, 10 min, 4 °C), supernatants were mixed with chloroform (1:5, 3 min, 25 °C) and centrifuged (12,000 xg, 15 min, 4 °C) to enable phase separation. The aqueous phase was reserved, mixed with isopropyl alcohol (1:1, 10 min at room temperature) and centrifuged (12,000 xg, 10 min, 4 °C) to precipitate RNA pellets. RNA pellets were washed with 75% ethanol (7,500 xg, 5 min, 4 °C), air-dried (10 min) and

suspended in 50 μ L of DEPC-treated water (10 min, 60 °C). RNA samples were immediately converted to cDNA for further use (as described below).

Synthesis of cDNA from the total RNA samples

First-strand cDNA synthesis from total RNA samples was performed using the SuperScript III first-strand synthesis system for reverse transcriptase (RT)-PCR (Invitrogen), according to manufacturer's instructions. Briefly, 20 μ L of RT mix (containing 2.5 ng/ μ L of random hexamer primers, 0.5 mM dNTPs, 1x RT buffer, 5 mM MgCl₂, 0.01 M DTT, 40 U of RNaseOUT, 200 U of SuperScript III RT and 8 μ L of RNA sample) were incubated as follows: 25°C for 10 min, 50°C for 50 min, 85°C for 5 min and chilled on ice. Finally, 2 U of RNase H were added, incubated for 20 min at 37 °C and the samples were stored at -20 °C until further use.

Selection of nucleotide sequences of interest used in primer design

Housekeeping genes for normalization of real-time PCR expression results were selected based on available literature: α -tubulin for *Leishmania* samples (Carter et al., 2006) and β -actin for mouse samples (Overbergh et al., 1999). Alpha-tubulin primers were designed using a consensus sequence present in α -tubulin mRNA sequences from several *Leishmania* species (GenBank: XM_001563114.1, XM_001563113.1, XM_001566562.1, AY702009.1, XM_001464016.1 and XM_001681731). Murine β -actin primers were designed against a region of divergence between *Mus musculus* β -actin mRNA sequence (Genbank BC138614.1) and *Homo sapiens* β -actin mRNA sequence (Genbank NM_001101.3) to avoid human contamination of PCR assays.

Primers were also designed for the analysis of *Leishmania* CPB (L-cathepsin-like CP) and CPC (B-cathepsin-like CP) expression. To design CPB primers, a consensus sequence from four *L. (L.) mexicana* CPB sequences (GenBank AJ319727.1, Z49963.2, Z49962.2 and Y09958.1) and a *L. (L.) mexicana* CPB mRNA sequence (GenBank M97695.1) were used. CPC primers were designed using the *L. (L.) mexicana* CPC gene sequence (GenBank Z48599.1).

Additionally, primers were developed to assess the expression of murine MHC class I and II genes. A consensus region from MHC class I genes was defined using sequences from two H-2 types: K (GenBank M18525.1 and M11975.1) and D (GenBank M18524.1 and L29190.1 and GeneID 14964). To define a consensus region for MHC class II, sequences from the α -chain of H-2 types E (GeneID 14968) and A (GeneID 14960) genes were used.

Design of primers

All primers used in this study were designed using Primer3 v. 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). All default settings were used, except for Product Size Ranges, which was set to 80-120 bp. Primers were synthesized by Invitrogen Brasil on a 50-nM scale and purified by desalinization.

Conventional PCR assays

PCR assays were performed using 50 μ L PCR mixtures consisting of: 1x Taq Platinum PCR buffer (Invitrogen), 4 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs (Invitrogen), 2 ng/ μ L of each primer, 1.25 U of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and DEPC-treated water up to 45 μ L. A total of 5 μ L of each cDNA sample (diluted 1:50 in DEPC-treated water) was used in each reaction. Samples were run in duplicates. The PCR conditions were as follows:

initial denaturation at 94 °C for 3 min (1 cycle); 40 cycles of denaturation at 95 °C for 20 sec, annealing at 56 °C for 30 sec and extension at 72 °C for 30 sec; and a final extension at 72 °C for 5 min. All PCR assays were performed using an Eppendorf Mastercycler thermal cycler. PCR products were separated by electrophoresis in 2% agarose gels (60 V for 5 min and 100 V for 1.5 h), visualized by ethidium bromide staining and photographed with an EasyDoc 100 photodocumentation system (Bioagency).

Sequencing of PCR products and BLAST analysis

PCR products were purified using Wizard SV Gels and the PCR Clean-Up System (Promega), according to manufacturer's instructions. Briefly, PCR products were mixed with membrane binding solution (1:1), incubated in SV mini-columns (1 min, room temperature), washed twice with membrane washing solution (with ethanol), centrifuged (10,000 xg, 5 min, 20 °C) and suspended in DEPC-treated water (50 µL) by centrifugation (10,000 xg, 1 min, 20 °C). Sequencing of PCR products was performed using the PDTIS/Fiocruz DNA sequencing platform (with a 3730 DNA Analyser – Applied Biosystems). The sequences obtained were utilized as queries in the NCBI Basic Local Alignment Search Tool [BLAST] (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), using the following parameters: nucleotide BLAST and BLASTn algorithms. The databases used were mouse genomic + transcript and Leishmania (taxid numbers: 5658 and 38568).

Real-time PCR assays

Real-time PCR assays were carried out using a 7500 Fast Real Time PCR System and analyzed with SDS 7500 software v. 2.0 (Applied Biosystems). Real-time PCR mixtures (12.5 µL) were comprised of 1x Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied

Biosystems), 0.1 μM of each primer and DEPC-treated water up to 10 μL . A total of 2.5 μL from each cDNA sample (diluted 1:50 in DEPC-treated water) was added to each real-time PCR reaction. Samples were tested in duplicates. The default thermal cycling conditions for the SDS 7500 were used (including the option for a continuous melting curve cycle), except for the amplification stage, in which the same settings used in the conventional PCR assays were applied. Fluorescence data were collected in each cycle at the extension step (72 $^{\circ}\text{C}$). To determine the efficiency of PCR assays, 2-fold serial dilutions of cDNA samples were used, with the threshold cycle (Ct) of each dilution being defined and plotted on a semi-log (log 10) graph for analysis. The slopes of accurate tendency lines ($r^2 \geq 0.98$) were used to determine the efficiency of the reactions ($E = -1 + 10^{(-1/\text{slope})}$). E values were used to adjust the Ct values for the assayed samples ($\text{Ct}_{E=100\%} = \text{Ct} \times [\log(1 + E)/\log 2]$).

Determination of relative gene expression

The comparative Ct method ($\Delta\Delta\text{Ct}$) was used to determine the levels of expression for the genes of interest. The calibrator used for comparison of *Leishmania* genes expression was log-phase promastigotes samples, while for murine genes healthy mice (both CBA and Balb/C) samples were used. Alpha-tubulin and β -actin genes were used as endogenous controls for *Leishmania* and murine gene expression, respectively. Relative quantity (RQ) values or normalized levels expression were obtained by the formula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

RESULTS

Selection of primers

Using the consensus sequences defined above and the Primer3 tool, we were able to design primer pairs to specifically amplify regions that generated real-time PCR-compatible amplicons (Table 1).

Standardization of PCR conditions by conventional PCR

To verify the specificity and functionality of the primers that were developed, and to define the most effective conditions for the PCR assays, a series of conventional PCR tests was performed. *Leishmania (L.) amazonensis* log-phase promastigote cDNA samples were used as controls for *Leishmania* primers and healthy Balb/C and CBA mice cDNA samples for murine primers. PCR settings were considered satisfactory when a single well-defined band was observed in a 2% agarose gel after electrophoresis of PCR products. Under the conditions established, all amplicon sizes were identical to the predicted product sizes (Figure 1). Subsequently, PCR products were sequenced and analyzed using BLAST to check for primer specificity. The results showed that each amplicon was ranked as similar to a compatible sequence (Table 2).

Analysis of specificity and efficiency of real-time PCR assays

Real-time PCR conditions were adapted from the protocol defined for conventional PCR using the same cDNA samples as controls. A single peak was observed in the melting curve of each reaction, indicating a unique product with a well-defined melting temperature (Table 3). Products from real-time PCR assays were also separated by electrophoresis in

2% agarose gels and sequenced. The results were identical to those previously obtained by conventional PCR products (data not shown).

The PCR amplification curves for each cDNA sample, a factor of key importance for a correct analysis of the relative expression data, were defined using 2-fold serial dilutions (1:2 – 1:64) of *L. (L.) amazonensis*-infected mice hindpaw lesion samples (20 weeks post infection for CBA and 16 weeks post infection for Balb/C) for *Leishmania* primers and healthy mice (CBA and Balb/C) hindpaw cDNA samples for murine primers. The primer pair and cDNA sample that presented the lowest efficiency was the murine MHC class I primers in the healthy CBA mice hindpaw cDNA sample with an efficiency of 58%. The other combinations had efficiencies ranging from 78% to 112% (Table 3). All of these distinct efficiencies were considered when performing relative expression analysis and used for Ct values adjustment.

Relative expression of MHC genes over the course of *L. (L.) amazonensis* murine infection

To account for differences that could occur in the expression of MHC genes due to genotypic variability, cDNA samples from two strains of mice with dissimilar levels of susceptibility to *L. (L.) amazonensis* infection were tested, including CBA mice with medium susceptibility (Neal & Hale, 1983) and Balb/C mice with high susceptibility (Calabrese & Da Costa, 1992). Samples were collected from two distinct sites, including the hindpaw (lesion) and its draining lymph node, in succession throughout the infection, from the 2nd to the 16th week after inoculation with parasites. Additional samples from the 18th and 20th weeks post-infection were collected for CBA mice, as they presented a slower lesion development when compared to Balb/C mice (Figure 2).

MHC class I RQ levels at the lesion sites of CBA mice presented a higher peak at the 10th week of infection, followed by an abrupt decrease and a lower peak by the 18th week. RQ analysis of MHC class II genes at this same site shows increasing gene expression levels until the 12th week, followed by a slight decrease and a second cycle of increasing expression up to the 18th week. RQ levels for expression of MHC class I genes were consistently higher than for MHC class II genes in lesion samples (Figure 3A). In contrast, at the lesion-draining lymph node site of CBA mice, MHC class I and II RQ levels were much more similar. At this site, both MHC classes presented peaks of expression at the 8th and 16th weeks and a lower expression level around the 10th week (Figure 3B).

At the lesion site of Balb/C mice, MHC class I RQ levels showed a tendency to rise starting at the 8th week after experimental infection and were undetectable prior to this. As for MHC class II genes, RQ levels reached peaks of expression at the 8th and 12th weeks, with a tendency to drop off in the latter weeks of infection. In contrast to the expression patterns of CBA mice, the levels of MHC class II genes were, in general, higher than for MHC class I (Figure 3C). At the site of the draining lymph node in Balb/C mice, MHC class II genes presented decreasing levels of expression in the first weeks, with a small increase around the 14th week. The expression of MHC class I genes was stably low throughout the course of infection. Once again, a general tendency of MHC class II RQ levels to be higher than those of MHC class I was observed (Figure 3D).

An interesting feature is the fact that in both murine strains tested the expression levels for both MHC class I and II genes were higher in samples taken from the lesion site than in those of the draining lymph node.

Predominance of *L. (L.) amazonensis* CPB gene expression over CPC gene expression during the course of murine infection

The RQ levels for *L. (L.) amazonensis* CPB and CPC genes were undetectable until the 8th week-post infection in the samples tested. Thus, a follow-up gene expression study throughout the course of infection was not performed. However, RQ levels for CPB genes were much higher than for CPC genes in all samples tested in any week of the infection course for both CBA and Balb/C mice, as shown in a set of representative samples from the 12th week post-infection (Figure 4). It is also noteworthy that RQ values for CPB genes, but not CPC genes, tended to be higher in Balb/C mice than in CBA mice.

DISCUSSION

The murine model of *Leishmania* infection is a very interesting model for the application of gene expression analyses. Such a model has been widely used for understanding many features of leishmaniasis, as it allows for a high level of control over characteristics that can influence the course of infection (Pereira & Alves, 2008).

Due to its high sensitivity and specificity, the real-time PCR technique can be used to understand the regulation of genes associated with host-parasite interactions. These analyses can help identify the roles that immune factors from the host and virulence factors from the parasite are playing in the evolution of the infection and how the distinct stages of the disease influence the regulation of gene expression in both organisms. In fact, a recent report shows that significant differential gene expression patterns are observed in macrophages infected by *L. (L.) amazonensis*, which indicates the relevant effects that this parasite causes on the host's cells gene regulation patterns (Osorio y Fortéa et al., 2009).

Our goal of this study was to combine the many advantages of a sensitive tool and a reliable model to establish a flexible methodology that is able to promote more understanding about the complex networks that link host and parasites during infection.

For this study, we selected genes that codify factors that play important roles in T cell responses in mice infected with *L. (L.) amazonensis*. The T cell response is a specific system that is directly linked to host resistance and susceptibility to infection. The balance of T helper cell responses is pivotal in mice infected with parasites from the *L. (L.) mexicana* complex. The predominance of a Th type 2 response is usually associated with exacerbation of the disease, while a predominant Th type 1 response is a good prognosis for disease control (Alexander & Bryson, 2005). Additionally, the activation of a cytotoxic T cell response directs the host to efficiently control infection (Ruiz & Becker, 2008).

Based on these data, we chose to investigate the gene expression patterns of MHC molecules in the murine host, given that they perform key roles in the definition of T cell responses, and CP enzymes for the *Leishmania* parasites, as many reports have shown that these enzymes can alter Th responses by an array of mechanisms (Mottram et al., 2004; Alves et al., 2004). Considering that our study is based on the expression of genes from the host immune system, we decided to focus on central sites in our model of murine experimental *Leishmania* infection, including the lesion and its draining lymph node.

We selected two strains of mice with distinct levels of susceptibility to *Leishmania* infection to perform our assays. We considered that infection-related gene expression patterns could differ due to genotypic variations and could relate to their ability to deal with the parasites. We speculated that differences in H-2 haplotypes could explain different growth of parasites in cutaneous lesions, considering that BALB/c mice (H-2^d) have larger lesions in contrast to CBA mice (H-2^k). Our hypothesis is that the genetic profile of these

animals influences the outcome of the immune response to whole proteins or peptide subunits of CPs (Alves et al., 2004).

The data obtained for the expression of MHC genes support this hypothesis, and we observed that MHC class I genes tend to have higher RQ values in CBA mice, whereas MHC class II gene expression predominates in Balb/C mice. This is a very interesting result because it shows that the more susceptible strain (Balb/C) has a higher expression of a MHC class that can lead to an ineffective response to infection (if promoting a Th2 response), while the more resistant strain (CBA) has higher expression of a MHC class related to inhibition of infection (by promoting a Tc response).

Therefore, the enhanced expression of MHC class II genes in Balb/C mice, both at the site of the lesion and in the draining lymph nodes, may be related to a reported role of CD4+ T cells in infection progression. This MHC class is classically related to this T cell type, and the absence of CD4+ T cells has been shown to be beneficial for the host to control infection (Silva et al., 1994).

CBA mice presented a steady predominance of MHC class I gene expression at the site of the lesion throughout the course of infection, but this pattern was different in the draining lymph node. In this site, there was a tendency for the expression of MHC genes to invert from class I to class II starting at the 16th week post-infection. Such variation may be related to previous data from our group, which indicate that lymph nodes from *L. (L.) amazonensis* infected CBA mice contain equivalent numbers of CD4+ and CD8+ T-cells (Alves et al., 2004). Perhaps the differences observed in the expression of genes that control T cell responses between Balb/C and CBA mice may account for their differential susceptibilities to infection.

As for the CP gene expression behavior of the parasite, we also noted a remarkable distinction between the two murine models tested. When infecting Balb/C mice, parasites tend to express CPB genes in higher levels than those that infect CBA mice. We conjecture that the higher CPB gene expression may have some relationship to the predominance of the MHC class II genes expressed in this susceptible strain. Along these lines, previous reports indicate that CPB enzymes act as modulators of the Th response (Mottram et al., 2004). Therefore, these enzymes may be important for the parasite to control the host Th response in the Balb/C infection model, while in the CBA infection model such control may have a lower level of impact due to a distinct lymphocyte response (Tc response).

Cysteine-proteinase C gene expression did not display any distinctive pattern between the strains of mice tested here, and its role in murine *Leishmania* infection remains unclear, even though this enzyme has been previously implicated in the activation of latent human transforming growth factor β (Somanna et al., 2002). Thus, it is possible that a low level of expression of this gene during murine infection is associated with an adaptation by the parasite in this stage of its life cycle.

Based on our results, it seems likely that the genotype of the mouse strain and parasite CPB genes are important for defining the development of cutaneous lesions in experimental infection with *L. (L.) amazonensis*. It is possible that these are congruent factors, which influence the polarization of T cell responses in *L. (L.) amazonensis* infected mice.

The data gathered in our assays led us to consider the massive potential of the gene expression assay developed here in helping to realize the fine interactions that occur between host and parasite in the murine model of *Leishmania* infection. By following up gene expression studies in both host and parasites during infection, and by comparing these

data in distinct models, specific questions can be addressed and eventually brought together to form a comprehensive panel of host-parasite interactions.

Furthermore, we propose that infection studies that apply a combination of gene expression methodologies that analyze protein levels would be of vast importance. Such an approach may lead to a profound understanding of the regulation and responses that occur in the murine model of *Leishmania* infection and, thus, lead to the development of very specific and efficient novel vaccines and chemotherapies..

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank PAPES (Fiocruz/CNPq) and FAPERJ for partial financial support of this research, and the PDTIS/Genomic-DNA Sequencing and Real-Time PCR technological platforms of Fundação Oswaldo Cruz for support in the assays. Dr Carlos R. Alves and Dr Constança Britto are fellows of the CNPq Institution. Bernardo A. S. Pereira is a post-graduate student supported by Fiocruz/CAPES.

REFERENCES

Alexander J, Bryson K 2005. T helper(h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett* 99: 17-23.

Alexander J, Coombs GH, Mottram, JC 1998. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol* 161: 6794-6801.

Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavete C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Veléz R, Moreno J 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 Years. *Clin Microbiol Rev* 21: 334-359.

Alves CR, Benévolo-De-Andrade TC, Alves JL, Pirmez C 2004. Th1 and Th2 Immunological profile induced by cysteine proteinase in murine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 26: 127-135.

Calabrese KS, Da Costa SC 1992. Enhancement of *Leishmania amazonensis* infection in BCG non-responder mice by BCGantigen specific vaccine. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 49-56.

Cameron P, McGachy A, Anderson M, Paul A, Coombs GH, Mottram JC, Alexander J, Plevin R 2004. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. *J Immunol* 173: 3297-3304.

Carter KC, Hutchison S, Henriquez FL, Légaré D, Ouellette M, Roberts CW, Mullen AB 2006. Resistance of *Leishmania donovani* to sodium stibogluconate is related to the expression of host and parasite γ -glutamylcysteine synthetase. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 88-95.

Lindoso JAL, Lindoso AABP 2009. Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 51: 247-253.

Marzochi MCA, Marzochi KBF 1994. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saúde Pública* 10: 359-375.

Mottram JC, Coombs GH, Alexander J 2004. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr Opin Microbiol* 7: 375-381.

- Neal RA, Hale C 1983. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniasis. *Parasitology* 87: 7–13.
- Osorio y Fortéa J, de La Llave E, Regnault B, Coppée JY, Milon G, Lang T, Prina E 2009. Transcriptional signatures of BALB/c mouse macrophages housing multiplying *Leishmania amazonensis* amastigotes. *BMC Genomics* 10: 119
- Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C 1999. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokines* 11: 305-312
- Pereira BAS, Alves CR 2008. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Vet Parasitol* 158: 239-255.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7: 581-596.
- Ruiz JH, Becker I 2007. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 29: 671-678.
- Silva EM, Bertho AL, Mendonça SC 1994. Effect of in vivo depletion of CD4+ T cells on experimental infection of susceptible BALB/c mice with *Leishmania amazonensis*. *Acta Trop* 56: 111–120.
- Somanna A, Mundodi V, Gedamu L 2002. Functional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from *Leishmania donovani* complex. Evidence for the activation of latent transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 277: 25305-25312.

TABLES

Table 1: Primer pairs designed for real-time PCR gene expression assays

Sequence of interest	Primers sequences	Predicted product size (bp)
<i>Leishmania</i> α -tubulin	Forward: 5'-TCAAGTGCGGCATCAACTAC-3' Reverse: 5'-GAGTTGGCAATCATGCACAC-3'	91
<i>Leishmania</i> CPB	Forward: 5'-AGGAGTTCAAGCGGACGTA-3' Reverse: 5'-CAGGTTGCGCTCGAAGTT-3'	84
<i>Leishmania</i> CPC	Forward: 5'-AAATGCAACACCACCTGTGA-3' Reverse: 5'-TTCGCCCTTGATGGAGTAAG-3'	81
Murine β -actin	Forward: 5'-GTTTTGTTTTGGCGCTTTTG-3' Reverse: 5'-AACTTTGGGGGATGTTTGCT-3'	88
Murine MHC class I	Forward: 5'-CGCTGAGGTATTCGAGACC-3' Reverse: 5'-AACTCCGTGTTGTCCACGTA-3'	88
Murine MHC class II (α -chain)	Forward: 5'-GTGGATCACTGGGGCTTG-3' Reverse: 5'-GACCCACAAACAACCCAAGA-3'	115

Table 2: NCBI BLAST results for *Leishmania* and murine PCR products

PCR product name	NCBI BLAST sequence name	BLAST expect value ^a	BLAST score (bits) ^b
<i>Leishmania</i> α -tubulin	<i>Leishmania major</i> alpha tubulin (LmjF13.0390) mRNA [GenID 5650068 LmjF13.0390]	4 x 10 ⁻¹³	73,4
<i>Leishmania</i> CPB	<i>Leishmania mexicana</i> mRNA for cysteine proteinase [GenBank Z14061.1]	5 x 10 ⁻¹⁵	84,2
<i>Leishmania</i> CPC	<i>L.mexicana</i> lmcpc gene cathepsin B-like cysteine proteinase [GenBank Z48599.1]	1 x 10 ⁻¹⁰	63,9
Murine β -actin [CBA]	<i>Mus musculus</i> actin, beta cytoplasmic (Actb) mRNA [Map Viewer NM_007393.2]	2 x 10 ⁻¹³	80,6
Murine MHC class I [CBA]	PREDICTED: <i>Mus musculus</i> similar to MHC class I histocompatibility antigen H-2 Q4 alpha chain precursor - mouse (LOC436493) misc RNA [GeneID 436493 H2-gs10]	4 x 10 ⁻⁰⁵	53,6
Murine MHC class II (α -chain) [CBA]	<i>Mus musculus</i> histocompatibility 2, class II antigen E alpha (H2-Ea) mRNA [Map Viewer NM_010381.2]	1 x 10 ⁻¹⁹	102
Murine β -actin [Balb/C]	<i>Mus musculus</i> actin beta, cytoplasmic (Actb) mRNA [Map Viewer NM_007393.2]	3 x 10 ⁻¹⁴	82,4
Murine MHC class I [Balb/C]	PREDICTED: <i>Mus musculus</i> MHC c6/g2 (Qa-2) protein (LOC634869) mRNA [GeneID 634869 LOC634869]	3 x 10 ⁻⁰⁷	59,0
Murine MHC class II (α -chain) [Balb/c]	<i>Mus musculus</i> histocompatibility 2, class II antigen E alpha (H2-Ea) mRNA [Map Viewer NM_010381.2]	4 x 10 ⁻¹³	82,4

^aBLAST expect value indicates the number of times the current match or a better one would occur in a search in the entire database by pure chance. A low expect value indicates a high significance for the match. ^bBLAST score (S') is a normalized value derived from the raw alignment score (S) by the following formula: $S' = (\lambda S - \ln K) / (\ln 2)$, where K and λ are the statistical parameters of the scoring system. It is useful to compare alignment scores from distinct searches.

Table 3: Analysis of specificity and efficiency of real-time PCR assays

PCR product	Melting temperature (°C) ^a	PCR efficiency (%) ^b
<i>Leishmania</i> α -tubulin	85.2	78
<i>Leishmania</i> CPB	85.2	92
<i>Leishmania</i> CPC	78.5	82
Murine β -actin [CBA]	77.9	101
Murine MHC class I [CBA]	83.0	58
Murine MHC class II (α -chain) [CBA]	79.7	86
Murine β -actin [Balb/C]	77.9	112
Murine MHC class I [Balb/C]	83.4	83
Murine MHC class II (α -chain) [Balb/c]	79.0	87

^aMelting temperature represents the temperature where 50% of a PCR product is dissociated (single stranded). ^bPCR efficiency (%) represents the percentage of product copies present at the beginning a PCR cycle that is doubled by the end of the cycle, as measured by fluorescence intensity.

FIGURES CAPTIONS

Figure 1: Analysis of PCR products by electrophoresis in 2% agarose gels. (L) 100-bp DNA ladder (Invitrogen), used as molecular weight marker. (1 – 3) PCR products obtained using primers for murine β -actin, MHC class I and MHC class II (α -chain) genes, respectively, with CBA mice hindpaw samples. (4 – 6) PCR products obtained using primers for murine β -actin, MHC class I and MHC class II (α -chain) genes, respectively, with Balb/C mice hindpaw samples. (7 – 9) PCR products obtained using primers for *Leishmania* α -tubulin, cysteine-proteinase B and cysteine-proteinase C, respectively, with *L. (L.) amazonensis* log-phase promastigote samples.

Figure 2: Development of lesions in Balb/C (■) and CBA (○) mice infected by *L. (L.) amazonensis*. Animals were infected subcutaneously with 1×10^6 log-phase promastigotes at the posterior left hindpaw. Follow-up of lesion development was carried out weekly by measuring the hindpaw width and height with a pachymeter. For each murine strain, three animals were chosen randomly each week for the measurements. Results represent the mean of three mice \pm standard deviation (SD).

Figure 3: Expression levels of MHC class I (□) and II (■) genes in murine cDNA samples along the course of *L. (L.) amazonensis* infection. Samples from CBA lesion site (A), CBA lesion-draining lymph node (B), Balb/C lesion site (C) and Balb/C lesion-draining lymph node (D) were collected every 2 weeks after inoculation of 1×10^6 log-phase promastigotes (2nd-20th weeks for CBA and 2nd-16th weeks for Balb/C mice). Results are shown in relative quantities (RQ). Murine β -actin was used as an endogenous control and healthy mice cDNA samples as calibrator. The figure shows a representative assay from a total of three replicates.

Figure 4: Expression levels of *Leishmania* CPB (■) and CPC (□) genes in murine cDNA samples from *L. (L.) amazonensis* infected animals at a representative time point post-infection (12th week). Samples from CBA lesion site, CBA lesion-draining lymph node, Balb/C lesion site and Balb/C lesion-draining lymph node were assayed. Results are shown in relative quantities (RQ). *Leishmania* α -tubulin was used as an endogenous control and

log-phase promastigotes cDNA samples as calibrator. The figure shows a representative assay from a total of three replicates.

FIGURE 1

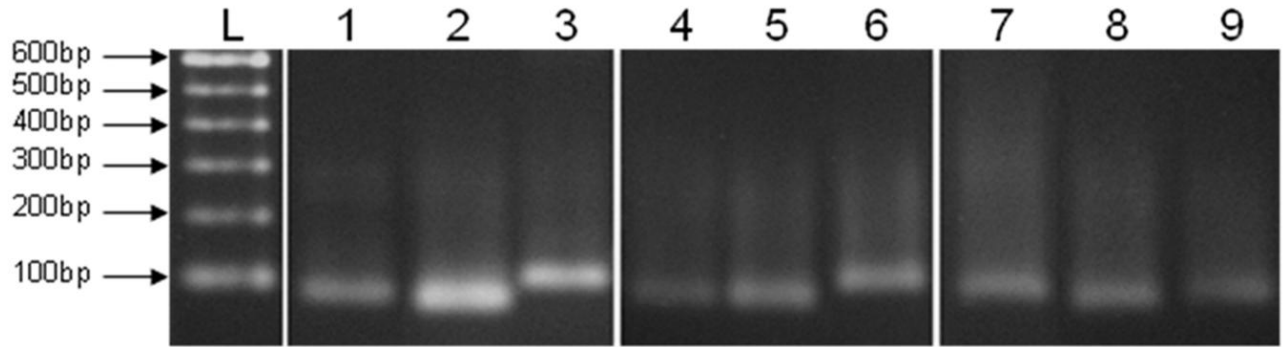


FIGURE 2

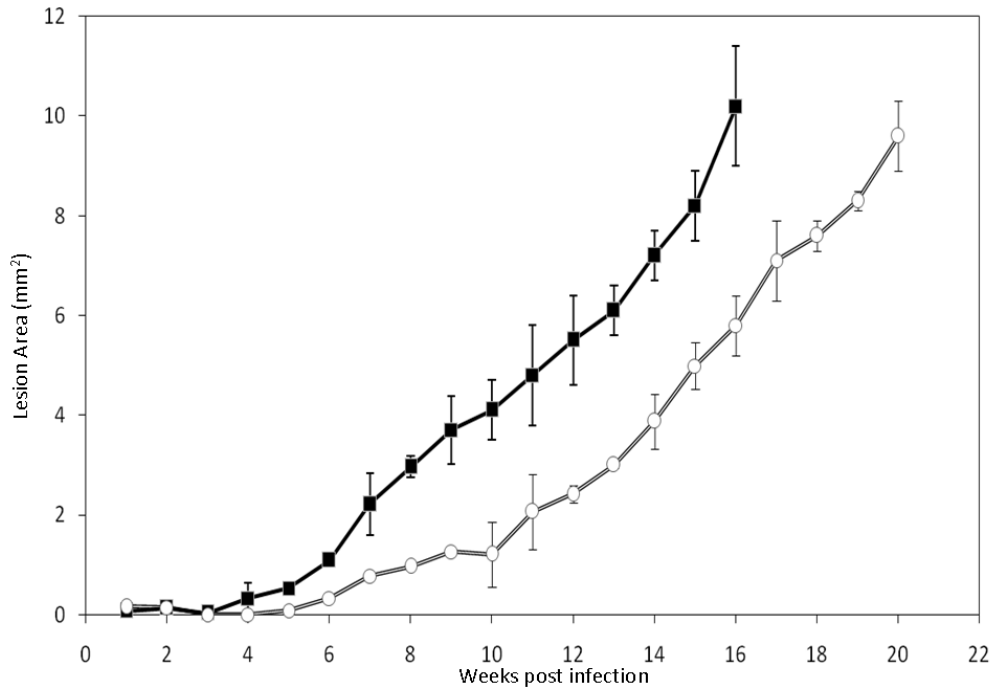


FIGURE 3

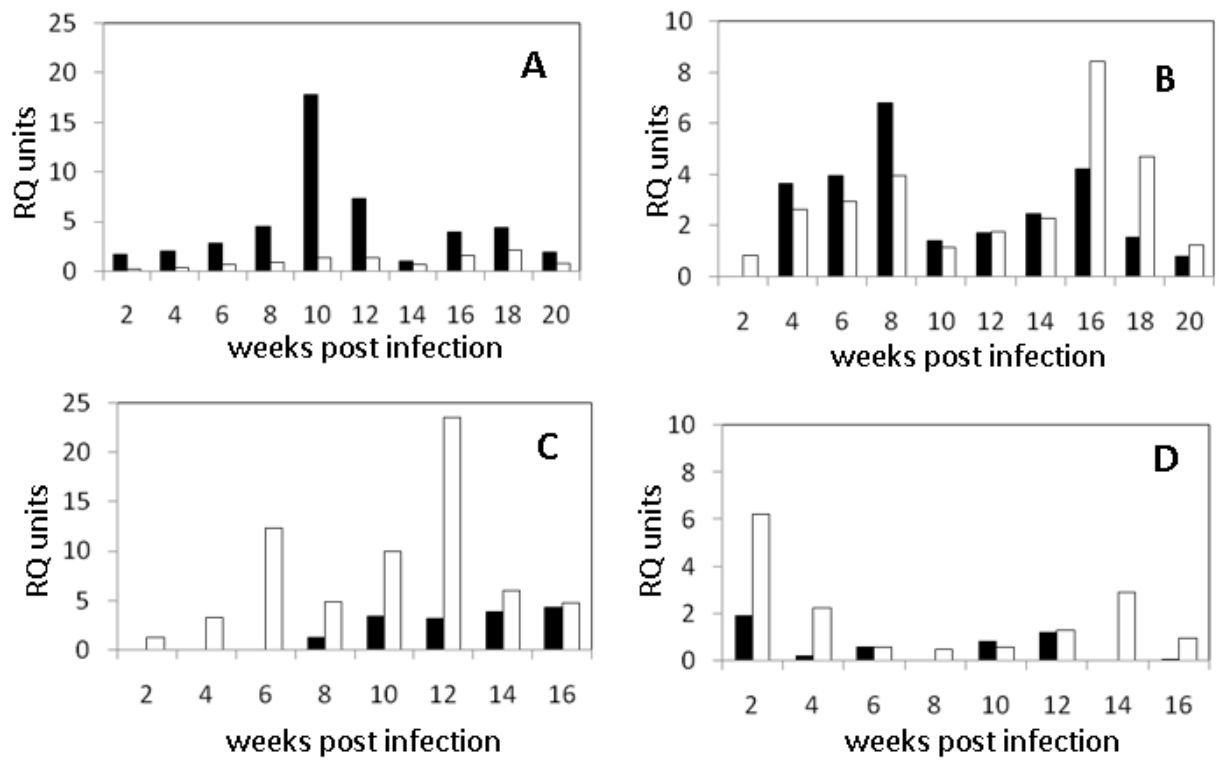
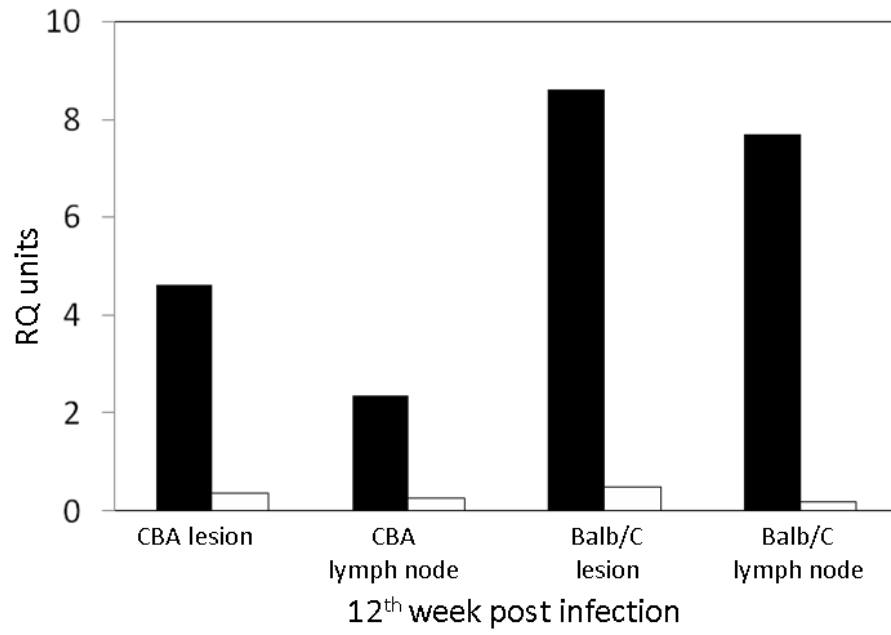
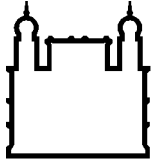


FIGURE 4





Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

To
Editorial Office
Journal of Biomedicine and Biotechnology

April, 23rd 2010

We are submitting the manuscript entitled “*In silico* predicted epitopes from the COOH-terminal extension of cysteine proteinase B inducing distinct immune responses during *Leishmania (Leishmania) amazonensis* experimental murine infection”, to be evaluated by the Editorial Board of the Journal of Biomedicine and Viotechnology. This manuscript analyzes the effects of predicted epitopes derived from the *Leishmania (Leishmania) amazonensis* cysteine proteinase B COOH-terminal extension over murine cell cultures, applying *in silico* epitopes mapping strategy, *in vitro* assays (as cell proliferation, cytokines production and T cell phenotype analysis) and *in silico* molecular docking (to investigate MHC/epitopes interactions).

Best regards,

Dr Carlos Roberto Alves

Dear Dr. Alves,

The Research Article titled "In silico predicted epitopes from the COOH-terminal extension of cysteine proteinase B inducing distinct immune responses during *Leishmania (Leishmania) amazonensis* experimental murine infection," by Bernardo Acácio Santini Pereira, Franklin Souza da Silva, Karina Mastropasqua Rebello, Marcel Marín-Villa, Yara Maria Traub-Cseko, Thereza Christina Benévolo-de-Andrade, Álvaro Luiz Bertho, Ernesto Caffarena and Carlos Roberto Alves has been received and assigned the number JBB/313785.

An editor will be assigned to handle the review process of your manuscript, and he/she will inform you as soon as a decision is reached.

All authors will receive a copy of all the correspondences regarding this manuscript. However, only the submitting author will be able to upload any revisions to the journal's manuscript tracking system.

Thank you for submitting your work to Journal of Biomedicine and Biotechnology.

Best regards,

Rasha Magdy
Journal Publishing Editor
Journal of Biomedicine and Biotechnology
Hindawi Publishing Corporation

***In silico* predicted epitopes from the COOH-terminal extension of cysteine proteinase B inducing distinct immune responses during *Leishmania (Leishmania) amazonensis* experimental murine infection.**

Pereira BAS¹, Silva FS¹, Rebello KM¹, Marin-Villa M², Traub-Cseko YM², Benévolo-de-Andrade TC³, Bertho AL⁴, Caffarena ER⁵, Alves CR^{1*}

¹Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, IOC/Fiocruz; ²Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Vetores, IOC/Fiocruz; ³Laboratório de Imunologia Clínica, IOC/Fiocruz; ⁴Laboratório de Imunoparasitologia, IOC/Fiocruz; ⁵Programa de Computação Científica, Presidência/Fiocruz.

*Corresponding Author: LABIMDOE – Avenida Brasil, 4365 Manguinhos Pavilhão Leônidas Deane – sl. 209 CEP: 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil / tel: +55 21 38658191; fax: +55 21 2590 3495; email: calves@ioc.fiocruz.br

ABSTRACT

An important characteristic of *Leishmania* is their ability to interfere in the host immune responses, as for instance the Th2 response, in order to aid parasite survival. Experimental mouse *Leishmania* infection has been widely used in the identification of specific parasite factors involved in pathogenicity, one of these being cysteine-proteinase B (CPB), which contains a unique COOH-terminal extension conserved among trypanosomatids and with a potential role in *Leishmania* infection. CPB inhibits Th1 and/or promotes Th2 responses either by its proteolytic activity or by epitopes derived from the COOH-terminal extension. In the present study we analyzed the effects of this CPB extension epitopes on cell cultures from murine strains with distinct levels of susceptibility to the infection: Balb/c, highly susceptible, and CBA, mildly resistant. Predicted epitopes, derived from *in silico* mapping, displayed the

ability to induce cell proliferation and the expression of cytokines related to Th1 and Th2 responses. Also, we applied *in silico* simulations to investigate how the MHC/epitopes interactions could be related to the immunomodulatory effects observed, finding evidence for specific patterns of interaction related to *in vitro* activities.

INTRODUCTION

Leishmaniasis, a vector-borne parasitic infection, is caused by protozoans of the genus *Leishmania*. This disease is characterized by its diversity and complexity, presenting a wide range of clinical forms in humans, ranging from self-healing skin lesions to fatal visceral leishmaniasis, depending on parasite species and host factors [1].

Leishmania presents a large world distribution and cause clinical cases of leishmaniasis with tegumentary or visceral lesions [2]. In Brazil, both clinical forms are present and, nowadays, leishmaniasis can be classified as a disease in expansion and without effective control [3]. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* has been reported as an important etiological agent of human leishmaniasis causing a wide spectrum of clinical diseases [4]. Interestingly, recent findings indicate that the geographical distribution of *L. (L.) amazonensis* is increasing in Brazil, accounting for unusual clinical presentations in new transmission areas [5].

Leishmania amastigotes are intracellular macrophage parasites which present a series of adaptive peculiarities in this phase of the biological cycle. The immunological responses profile of these infections can be studied using the murine model since distinct leishmaniasis clinical manifestations can be reproduced in inbred mice strains [6].

In the murine *Leishmania (Leishmania) major* infection model, a T-helper cell type 1 (Th1) immune response is effective against the parasites, while a Th2 response may lead

to disease exacerbation. Thus, the outcome of infection is determined by the balance between these two types of response [7]. However, such well-defined roles for the Th1 and Th2 responses are not observed for murine infections caused by the *Leishmania* (*Leishmania*) *mexicana* complex species, as *L. (L.) amazonensis* [8]. In this case, the ability to control the infection has been associated with an insufficient Th1 response, rather than a dominant Th2 response. Thus, the distinct levels of susceptibility to infection observed in different mouse strains, Balb/c mice being highly susceptible and CBA mice having some degree of resistance, may be due to differences in Th response balance.

In this context, cysteine proteinases (CPs) (E.C. 3.4.22) are virulence factors for *Leishmania* with immunoregulatory properties during infection [9]. Most of the studies on *Leishmania* CPs are centered in a few enzymes, denominated CPA, CPB and CPC, all of which are similar to papain and belong to the same group of CPs (designated Clan CA, Family C1). However, a detailed analysis of the *L. (L.) major* genome database revealed the existence of genes that are predicted to codify for a total of 56 CPs, subdivided into 4 Clans and 13 Families [9].

The current focus of our studies is CPB, a cathepsin L-like enzyme [10] which presents exclusive characteristics when compared to other CPs: an extension of about 100 aa in the COOH-terminal extension and the presence of multicopies organized as tandem array in the parasite genome [9]. CPB from *L. (L.) mexicana* and *L. (L.) amazonensis* have been shown to have a role on the Th1/Th2 responses balance by cleaving type II major histocompatibility complex (MHC) molecules in the host parasitophorous vacuole [11], cleaving the interleukin (IL)-2 and immunoglobulin (Ig) E receptors, inducing IL-4 expression [12], inhibiting IL-12 production in macrophages and dendritic cells [13] and by cleaving mammal host nuclear factor kappa B (NF- κ B) [14].

Considering that during the processing of pre-CPB to its mature form the COOH-terminal extension is processed [15], secreted [16] and can be observed within host cells cytoplasm [17], this released fragment may also play a role in the host-parasite interaction [18].

Our group previously published an *in silico* study using physicochemical analysis for T cell epitope prediction, that allowed the identification of three peptides from the putative *L. (L.) amazonensis* CPB COOH-terminal sequence. As the complete sequence for the *L. (L.) amazonensis* CPB COOH-terminal extension was not available, *L. (L.) mexicana* CPB COOH-terminal sequence was used as a template due to these two species phylogenetic proximity. In that study, three peptides with electric charges, hydrophobicity and isoelectric points compatible with the binding to MHC molecules were selected [19].

These peptides were chemically synthesized and used *in vivo* and *in vitro* studies using BALB/c and CBA mice. One of these peptides caused an exacerbating effect on BALB/c mice lesions, when used in vaccination assays. Also, blastogenesis assays indicated that CD8⁺ T-cells proliferated more intensely than CD4⁺ T-cells in the presence of this peptide. When cytokine levels were assessed, interferon (IFN)- γ , a Th1 response-related cytokine, was detected only in the supernatant of CBA lymph node cell culture, while IL-4, a Th2 response-related cytokine, was detected in the supernatant of cell culture from both lineages. Additionally, nitric oxide (NO) was detected only in the supernatant of CBA cell cultures [20].

Such data corroborate the potential of CPB as an inducer of a Th2 immune response, showing that peptides derived from this enzyme may be influential co-stimulatory signals in T-cell polarization during leishmaniasis, able to interfere in the balance of the Th1/Th2 immune responses.

In the present study, we searched further for peptides derived from the COOH-terminal extension of *L. (L.) amazonensis* CPB showing immunomodulatory effects. This was done by using current online algorithms to directly define peptides able to bind to MHC molecules and by using *in vivo* and *in vitro* assays to assess the effect of the various peptides on mouse strains with distinct levels of susceptibility to *L. (L.) amazonensis* infection.

MATERIALS AND METHODS

Cultivation of parasites

L. (L.) amazonensis MHOM/BR/77/LTB0016 strain promastigotes (obtained from Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC/IOC - Fiocruz) were grown in Schneider's medium (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS – Gibco, Invitrogen, Brazil) for 4 days at 28 °C. For experimental infections, parasites were washed 3x with 50 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) centrifuged at 2,000 xg for 10 min at 4°C, counted using a Neubauer chamber and suspended in PBS at a concentration of 2×10^7 cells/mL.

Mice and experimental infection

Specific pathogen-free female 5-7 week old mice (strains Balb/c and CBA) were obtained from the animal care facility of Fiocruz (Centro de Criação de Animais de Laboratório – CECAL/Fiocruz). For experimental infection, each animal was inoculated subcutaneously with 1.0×10^6 log-phase promastigotes in PBS (50 µL) in the left hindpaw. All procedures using animals were approved by the Animal Ethics Committee of Fiocruz (Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Fiocruz; L-0006/07).

Sequencing of *L. (L.) amazonensis* CP COOH-terminal extension

DNA was extracted from 1.0×10^8 log-phase promastigotes using the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA). PCR was performed using specific sense and antisense primers for the COOH-terminal extension of *L. (L.) pifanoi* CP Lpcys2 (5'-GGATCCGCACCCAGACCCGTGATG-3' and 5'-AAGCTTCTACGTGTAGTGACAGGT-3') [16] and the PCR Core System (Promega). The PCR conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 1 min (1 cycle); 40 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 60°C for 30 sec and extension at 72°C for 1 min; and a final extension cycle (72°C, 5 min). All PCR assays were performed using an Eppendorf Mastercycler thermal cycler. The reaction products were analyzed by agarose (1%) gel electrophoresis stained with ethidium bromide. The desired band was extracted using Wizard SV gel and PCR cleanup system (Promega) and inserted into pGEM-t Easy vector (Promega).

Escherichia coli competent cells were transformed by thermal shock method and grown overnight at 37°C on LB-agar plates supplemented with 100 µg/mL of ampicillin, 40 µg/mL of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside and 40 µg/mL of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside. Recombinant bacteria were grown in liquid LB medium supplemented with 100 µg/mL ampicillin. Plasmids were prepared using STET solution (8% saccharose, 5% Tris-HCl pH 8.0, 50 µM EDTA pH 8.0, 5% Triton X-100), purified with polyethylene glycol 8000 and sequenced by PDIIS/Fiocruz DNA sequencing platform (using a 3730 DNA Analyser – Applied Biosystems).

The results and quality of the sequencing were assessed with BioEdit Sequence Alignment Editor Software and the sequences submitted to NCBI Basic Local Alignment Search Tool [BLAST] (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), to check for similar sequences.

T cell epitopes mapping strategy and peptide synthesis

Potential T cell epitopes derived from the COOH-terminal extension were selected *in silico*, using the combination of a T cell epitope binding algorithm (SYFPEITHI - www.syfpeithi.de) with proteasome cleavage prediction algorithms (NetChop - www.cbs.dtu.dk/services/NetChop; PProC - www.paproc.de). In this study we considered only H2-K molecules for MHC-binding prediction. The cutoff used for the results obtained in the SYFPEITHI algorithm was a score value of 10, as it indicates the possibility of existence of at least one major anchor-amino acid at the analyzed peptide sequence. Only the peptides present in the intersection of the results from all used algorithms were elected for the study. Such strategy was used aiming to emulate more precisely the actual *in vivo* processing of peptides that bind to MHC molecules. The elected peptides were chemically synthesized by Creosalus (USA) with 95% of purity (checked by HPLC) and predicted MW-compatibility verified by ES-MS. Contamination of the predicted epitopes by endotoxin was verified using Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000 kit (Lonza), according to manufacturer's instructions.

Proliferation assays *in vitro*

Blastogenesis assays were performed with cells isolated from lesion draining lymph nodes of mice (Balb/c or CBA) 10 weeks post-infection with *L. (L.) amazonensis*. After isolating and counting viable cells, these were resuspended in RPMI medium containing 2% FBS and seeded into 96-wells flat bottom microplates (5×10^5 cels/well). Positive proliferation controls were carried out by adding concanavalin A (Con A) to the wells (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Particulate *Leishmania* antigen (PLA) was used as specific proliferation control. This antigen was obtained by submitting *L. (L.) amazonensis* promastigotes to successive freeze-thaw cycles and centrifugation at $10,000 \times g$, 60 min and 4°C , after which the pellet was discarded. Both PLA and the predicted epitopes were assayed at a

concentration of 30µg/mL. The cell culture microplates were kept for 3 days at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. Prior to the collection of the cells onto filter paper, in the final 16h of incubation, 0.1 µCi of [³H]-thymidine was added to each well. The amount of radioactivity incorporated by the cells was measured (in counts per minute - cpm) using a beta scintillation counter (1600 CA, Packard Instrumental Co., USA) and scintillation liquid (toluene with 0.005% POPOP and 0.6% PPO).

Phenotypic analysis of the T cells and cytokines and NO production analysis

The phenotype of the peptide-responding cells from *L. (L.) amazonensis* infected mice (Balb/c and CBA) was determined using 2.5×10^6 lymph node cells/mL cultured in 24-well flat-bottom plates (Nunc) under the same conditions described above. The same positive and specific proliferation controls were used. After 3 days in culture, the supernatant was withdrawn and used in cytokine and NO₂ experiments (see below) and the cells were harvested, washed with PBS (500 xg, 10 min, 4°C) and resuspended in PBS added with 0.05% sodium azide and 2% FBS. Specific monoclonal antibodies PE-Cy5 Rat Anti-mouse CD4 and PE Rat anti-mouse CD8a (BD Pharmingen, USA) were added [1:100] and the cell suspensions were incubated for 30 min at 4°C. Cells were later washed with PBS (500 xg, 10 min, 4°C), resuspended at PBS added of 1% paraformaldehyde and analyzed using an EPICS ALTRA flow cytometer (Beckman Coulter). For each sample, 10,000 lymphocytes were recorded in list mode, and registered on a logarithmic scale histogram. Analysis was performed with the EXPO32™ (Applied Cytometry Systems – Beckman Coulter, USA) and Summit 4.3 (Dako, USA) softwares.

The levels of cytokines related to Th1 response (IL-12 and INF-gamma) and to Th2 response (IL-10 and IL-12) in the supernatants of cell cultures obtained from

immunophenotyping assays were assessed with Quantikine colorimetric sandwich ELISA kits (R&D systems), according to manufacturer's instructions.

The nitrite (NO₂) concentration was used as a measure of nitric oxide (NO) production in the same supernatants using Griess reagent, as described previously [21]. Briefly, 100 µL of the supernatants was added to wells from 96-wells flat bottom plates and mixed with 100 µL of Griess reagent (2,5% phosphoric acid with 0.1% naphthylene diamine 2 HCl and 1% sulphanilamide). After incubation for 10 min at room temperature, absorbance for each well was defined at 540 nm. A standard curve using sodium nitrite (0-200 µM) was used to assess NO concentration in the supernatants.

***In silico* assays (molecular docking)**

For the docking simulations, we used murine class I MHC molecules as receptors. The structural data for H-2K^d (Balb/c) and H-2K^k (CBA) molecules were obtained from Protein Data Bank (PDB codes: 1vgk and 1zt1, respectively). The H-2K^k molecule was co-crystallized with Influenza virus peptidic ligands (FEANGNLI), while H-2k^d was obtained in complex with a synthetic peptide (SYVNTNMGL).

The original ligands present at each H-2 molecules, in their conformations retrieved from PDB file, were mutated using the Swiss-PDB viewer software to match the selected putative epitopes, keeping unchanged the crystallographic conformations of their backbones.

The H-2/epitope file complexes, for docking assays, were simulated using the GROMOS 96 force field. Initial structures were optimized by minimizing potential energy to adequate molecular crystallographic coordinates to the force field. Partial atomic charges and the protonation states were defined for each molecule and, finally, the putative ligands were set to a semi-flexible state, where only the ligands rotational,

translational and conformational angles were allowed to change, keeping the receptor rigid, using AutoTors software.

Three highly conserved water molecules present in the H-2 active sites, which are known to play important roles both in the maintenance of the active site structure and in the ligand binding, were kept in the H-2 structures for the docking assays [21].

The data from the crystallized H-2 molecules (receptors) were then separated from those of the ligands. New files containing the H-2 data along with their atomic forces (generated by the GROMOS 96 force field) and the solvation parameters of each atom present were created, considering the amino acids protonation state under pH 4.0 (zwitterionic state [22]).

The AutoDock 3.5 software was used to perform the molecular dockings. The grids matrix was calculated using a spacing of 0.375 Å. The center of each grid was defined using the central atom of the ligand backbone as reference.

For each putative epitope, 2048 docking simulations were run, each, summing up a total of 2048 models defined for each epitope. These models were clustered in families using the root mean square deviation (RMSD) value between solutions, i. e. two solutions were considered as members of the same family if their rmsd value was less than 3.5 Å. The model presenting both the lower docked energy value and lower intermolecular energy value in each family was chosen for further analysis. The representative model of each family was assessed in conjunction with its related H-2 active site structure to identify the intermolecular interactions.

The types of interaction analyzed were: hydrogen bonds and Van der Waals contacts. For the study of the interactions, only the five first families obtained for each putative epitope were regarded for analysis. Only the residues of each H-2 molecule that interacted at least 50% of the tested models were considered as relevant and conserved.

Statistical analysis

Data from the *in vitro* assays were analyzed for statistical significance, using an unpaired Student's *t*-test, and considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Sequencing of the *L. (L.) amazonensis* CPB COOH-terminal extension

The nucleotide sequence of the *L. (L.) amazonensis* CPB COOH-terminal extension was defined using primers previously designed for an analogous region of *L. (L.) pifanoi* CPB and the deduced amino-acid sequence was determined (Figure 1).

This sequence presented up to 93% of identity with sequences of CPs from other *Leishmania* species belonging to the *L. (L.) mexicana* complex and up to 68% with species from other complexes, as indicated by a protein BLAST analysis using the compositional matrix adjust method.

***In silico* prediction of T cell epitopes present at the COOH-terminal extension of *L. (L.) amazonensis* CPB**

The deduced amino acid sequence for the COOH-terminal extension of *L. (L.) amazonensis* CPB was analyzed by online algorithms to predict proteasome cleavage (NetChop and PAMProC) and MHC-binding peptides (SYFPEITHI). Only peptides predicted by the three algorithms used were considered for this study (Table I). These predicted epitopes were then synthesized for *in vitro* and *in vivo* analyses. All predicted epitopes were tested for endotoxin presence and presented values below threshold (data not shown).

Each synthetic peptide was assayed *in vivo* and *in vitro* only with the mouse strain that presented the haplotype to which it showed binding properties in SYFPEITHI analysis.

Thus, P1, P4, P5, P6, P7 and P9 were assayed only with Balb/c mice, P3 and P9 were assayed only with CBA mice, while P2 and P8 were assayed with both mice strains.

T lymphocytes proliferative responses induced by synthetic peptides

Assays carried out with Balb/c cells showed that peptides P4 and P5 were able to induce some cell proliferation when co-incubated with lymph node cells (increase in cell numbers of 2.2x and 1.7x, respectively) (Figure 2A). As for CBA mice cells, peptides P2, P8 and P9 also showed activity (increase in cell numbers of 2x, 1.7x and 2.3x, respectively) (Figure 2B). Positive blastogenesis control with Con A increased cell numbers in Balb/c and CBA cell cultures by 7.2x and 6.2x, respectively. Specific response blastogenesis control with PLA also showed an increase in cell numbers by 1.9x and 1.4x for Balb/c and CBA, respectively.

Influence of the predicted epitopes on lymph node cells phenotype

Balb/c lymph node cells incubated with P5 and P6 showed a decrease in the percentage of CD8⁺ cells present in the culture (31% and 17% decrease when compared to control cultures, respectively). In contrast, peptide P8 was able to increase the percentage of Balb/c CD8⁺ cells by 34% (Figure 3A).

As for percentage of CD4⁺ cells in the cultures, P8 was able to reduce the number of this cell type in the Balb/c lymph node cells by 65% (Figure 3D).

None of the tested peptides was able to significantly alter CD8⁺ or CD4⁺ percentages in lymph node cell cultures from CBA mice.

P8 showed a strong influence over both CD4⁺ and CD8⁺ in Balb/c cells, being able to alter the proportions between these two cell types in the culture. While the CD8⁺:CD4⁺ proportion in control cultures was of 0.5, P8-incubated cultures presented a proportion of 1.8. Peptides P5 and P6 also altered the proportion between these two cell types, but

as they influenced only CD8⁺ cell numbers these alterations were less significant, establishing a CD8⁺:CD4⁺ proportion of 0.3, after incubation with peptides.

Blastogenesis positive control cultures (incubated with Con A) did not present any variations on CD8⁺:CD4⁺ proportions, while cultures with PLA had a tendency of showing results analogous to what was observed for P8: CD8⁺ percentage increased by 115%, CD4⁺ percentage decreased by 75% and CD8⁺:CD4⁺ proportion of 3.5.

Production of cytokines and nitric oxide by cells in culture incubated with predicted epitopes

The levels of cytokines related to Th1 and Th2 responses were analyzed in the supernatants of lymph node cell cultures coincubated with the predicted epitopes. Also, in parallel, we analyzed NO levels in these supernatants. The basic values of all the assays (the mean values obtained for negative control cell cultures) were subtracted from the values obtained from all the samples and positive controls. The cytokine profiles in these cell cultures can be related to the capacity of the infected mice to control *Leishmania* infection, thus these parameters were analyzed in cell cultures from Balb/c (Table II) and CBA (Table III) mice. Two Th2-related cytokines (IL-4 and IL-10) and two Th1-related cytokines (IL-12 and INF- γ) were tested.

In Balb/c cell cultures, predicted epitopes P1 and P2 promoted the expression of Th1-related cytokines (IL-12 and INF- γ , respectively), while P6 promoted the expression of IL-10 (Th2-related). The predicted epitope P4 was able to induce cytokines related to both Th responses in these cell cultures (IL-10 and INF- γ). Con A and PLA controls were able to induce the expression of all tested cytokines.

Assays with CBA cells evidenced the capacity of predicted epitopes P2 and P3 to induce the expression of a Th1-related cytokine (IL-12), whereas epitope P8 induced the expression of a Th2-related cytokine (IL-10). As observed in Balb/c cell cultures, one of the tested

predicted epitopes (P9) was able to promote the expression of cytokines related to both Th responses (IL-10 and IL-12). In CBA cell cultures, Con A displayed an activity similar to the pattern observed with Balb/c cells, but PLA was unable to promote IL-12 expression, although inducing the expression of all other tested cytokines.

None of the tested predicted epitopes were able to induce NO production in cell cultures from the tested murine strains, although, in Balb/c cultures, Con A and PLA enhanced NO levels in supernatants. In CBA cell cultures, only PLA enhanced NO levels in the supernatant.

H-2/peptides complexes interactions predicted by molecular docking assays

The number of hydrogen bonds and van der Waals contacts, and the intermolecular energy of the complexes were calculated using virtual models in molecular docking assays (Figures 4, 5 and 6). Such parameters are important to understand how the H-2 molecules and ligands interact and patterns of molecular interactions observed may be related to the biological effects caused by the peptides.

The docking assays predicted that some amino acids from the H-2 cleft have key importance in the interaction of the MHC molecule with the epitope, as they displayed the capacity of forming high numbers of hydrogen bonds and Van der Waals interactions. For the haplotype d (H-2K^d) these apparently prevalent amino acids are: glutamine 63, arginine 66, tryptophan 73, arginine 97, threonine 143, tryptophan 147, tyrosine 155 and tyrosine 159. Also, some amino acids seem to have importance only for Van der Waals interactions: phenylalanine 99, tyrosine 156 and tryptophan 167. As for the other haplotype analyzed (CBA mice - H-2K^k), the amino acids that presented importance for hydrogen bonds and Van der Waals interactions are: asparagine 70, asparagine 77, tyrosine 99, tyrosine 116, tryptophan 147 and asparagine 156, whereas

those important only for Van der Waals interactions are: tyrosine 7, arginine 97, tyrosine 123, arginine 155 and tyrosine 159.

In addition, the participation of some amino acids residues from the MHC cleft in the epitope binding was observed as predominantly or exclusively occurring for epitopes able to induce the expression of a specific cytokine or a combination of cytokines in the cell cultures.

Epitopes able to induce IL-10 expression in Balb/c cell cultures (P4 and P6) presented the exclusive capacity to form hydrogen bonds with the residue tyrosine 7 and Van der Waals contacts with the residue cysteine 164. They were also able to form more hydrogen bonds with residues tryptophan 73 and tyrosine 159 than other tested epitopes and to form more Van der Waals contacts with residue tyrosine 173.

In this same mouse strain, epitopes able to induce the expression of IFN- γ (P2 and P4) formed more hydrogen bonds with residue glycine 63 and Van der Waals contacts with residues phenylalanine 33 and serine 77. The only epitope able to induce IL-12 expression in Balb/c cell cultures (P1) did not present exclusive interaction, but formed more hydrogen bonds to residues tryptophan 147 and aspartate 152.

As for the epitope P4, which was able to induce both IL-10 and IFN- γ expression, it presented exclusive hydrogen bonds with residues tyrosine 171 and Van der Waals contacts with residues tryptophan 133 and glycine 149. It also had a higher capacity to form hydrogen bonds to residue tyrosine 156 and Van der Waals contacts to residue glycine 63.

In CBA cell cultures, epitopes able to induce IL-10 expression (P8 and P9) were the only ones to form hydrogen bonds to residue arginine 155 and with the H-2K^k cleft conserved water molecule 373. The epitopes that induce IL-12 production (P2 and P3)

formed exclusive Van der Waals contacts with residues glycine 65, glycine 69 and phenylalanine 74; these same predicted epitopes formed more hydrogen bonds with residue aspartate 156 and Van der Waals contacts with residue asparagines 7 than other tested epitopes.

Finally, the predicted epitope which was able to induce IL-10 and IL-12 expression in CBA cell cultures (P9) formed exclusive hydrogen bonds to residue tyrosine 45 and Van der Waals contacts to residue aspartate 152.

DISCUSSION

Infection by *L. (L.) amazonensis*, as by other *Leishmania* species, is a very complex process where many factors from both parasite and host interact with each other and influence the immune system and virulence system to respond in specific ways, thus determining the outcome of the infection. Some *L. (L.) amazonensis* factors are able to directly interfere with the host immune system and lead to a response that benefits parasite survival [11] – a possible strategy to escape from the mammalian immune response.

So, in the present study, we have aimed at defining a strategy that, combining *in silico*, *in vivo* and *in vitro* assays, would help to identify epitopes from *L. (L.) amazonensis* that present immunoregulatory properties. We based our present analysis on epitopes derived from the COOH-terminal extension from *L. (L.) amazonensis* CPB, as our group had previously tried to define, by other methodologies, epitopes from this same region [19,20]. In our previous reports, epitope mapping was performed by analyzing structural and chemical information of amino acids sequences rather than by applying sequences to algorithms designed for the simulation of epitopes processing and MHC interaction.

We initially sequenced the COOH-terminal region from *L. (L.) amazonensis* CPB, as it had not been previously described. The sequence obtained, although very similar to the sequence described for *L. (L.) mexicana*, presented some differences in the deduced amino acid sequence, thus indicating the possible existence of epitopes exclusive for *L. (L.) amazonensis*. These exclusive epitopes may be related to some particularities of the infection caused by this *Leishmania* species, perhaps contributing to the stimulus of sub-populations of T lymphocytes related to pathogenesis, as CD4+ T lymphocytes [24].

We used PLA, a total lysate from the parasite, as a specific control in our assays, since it contains many potential epitopes. This control induced blastogenesis in cell cultures from infected mice, apparently favoring CD8+T cells proliferation in detriment to CD4+ and inducing the production of cytokines related to both Th1 and Th2 immune responses. Such effects of PLA are compatible to what was observed for another mixture of parasite molecules - SLA [20] - and may be related to the differences observed *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) major* murine infections: while a mixed Th1/Th2 responses profile can be observed in murine infections by *L. (L.) amazonensis*, there is always a unique and clearly define Th response present in infections by *L. (L.) major* (either Th1 or Th2, depending on the mouse strain) [25,26].

Based on these observations, we performed assays designed to understand if all epitopes derived from the COOH-extension of CPB would induce a unique and well-characterized Th response or if there would be epitopes stimulating simultaneously distinct Th responses. Our results indicated that the latter hypothesis is true: some predicted epitopes were able to induce the production of Th1-related cytokines, others the production of Th2-related cytokines and some even induced the production of cytokines from both Th responses. It is interesting to note that CD8+ T lymphocytes

may also present profiles of cytokines expression in a manner similar to CD4⁺ T lymphocytes [27] and, so, may be the cell type responsible for the production of the cytokines in the cell cultures. Yet, no tested epitope was able to induce NO production in cell cultures of Balb/c or CBA mice.

This diversity of stimuli by the tested epitopes points towards a possible survival strategy of the parasite: by overloading the host immune system with multiple immunomodulatory antigens, the parasite may induce it to elicit a series of inefficient responses and, thus, render it unable to properly control the infection. These inefficient responses would be translated as the double profile Th1/Th2 observed in murine infection by *L. (L.) amazonensis* [25, 26].

Also, in our study, we noted that stimulation for cytokines production seems to be unrelated to stimulus for proliferation. A possible explanation for this fact may be an inhibition of IL-2 or its receptor production in lymphocytes by the parasites: such strategy would limit the area of an immune response, allowing for a dissemination of the infection. Still, the effects of parasites on IL-2 production remain to be studied.

Complementary to the *in vitro* assays, *in silico* simulations of the interactions between MHC and the predicted epitopes were performed. These simulations were helpful to indicate some major amino acid residues of the MHC cleft that act on the epitope binding. More importantly, they indicated some patterns of interaction MHC/epitope that seem to be related to the stimulus to produce a specific cytokine. Further studies with increasing numbers of epitopes that stimulate specific cytokines in experimental murine infection with *Leishmania* are required, but our results provide a preview of a powerful study methodology to understand immunomodulatory effects of this parasite.

We were able to confirm, by the data gathered in this study, the potential of the COOH-terminal extension from *L. (L.) amazonensis* CPB to influence the outcome of

experimental murine infections by interfering, through its derived epitopes, with the balance of Th1 and Th2 cells, as we had previously proposed [20].

Taken in conjunction with our previous reports, our present results shed light over yet another specific aspect of the highly complex and fine-tuned network of interactions that regulates the outcome of *Leishmania* infection in mice. Also, we believe that, if applied to the study of other potential immunoregulatory molecules from the parasite, the methodological approach drafted here may be very helpful for a fast definition of epitopes derived from parasites proteins.

CONCLUSIONS

The proposed methodology for epitope mapping of *Leishmania* proteins was shown to be very useful. Many distinct predicted epitopes from the COOH-terminal extension from *L. (L.) amazonensis* CPB were able to promote the expression of distinct cytokines in murine cell cultures, thus showing important immunomodulatory properties of this extension.

This first use of molecular docking technique to analyze the interaction between epitopes and MHC molecules in the murine model of experimental *Leishmania* infection showed evidences of a relation between the capacity of an epitope to induce the expression of specific cytokines in the cell cultures and its interaction with key amino acids residues in the MHC cleft.

ACKNOWLEDGMENTS

This study received financial support from PAPES IV (CNPq/Fiocruz) and FAPERJ. Bernardo Acácio Santini Pereira is a doctorate student supported by Fiocruz/CAPES. Dr. Carlos Roberto Alves is a fellow researcher of CNPq institution.

REFERENCES

- [1] Herwaldt BL 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354:1191-1199.
- [2] Awasthi A, Kumar R, Saha B 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res* 119: 238-258.
- [3] Oliveira CC, Lacerda HG, Martins DR, Barbosa JD, Monteiro GR, Queiroz JW, Sousa JM, Ximenes MF, Jeronimo SM 2004. Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. *Acta Trop* 90:155-162.
- [4] Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Júnior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM et al 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 44:536-546.
- [5] Azeredo-Coutinho RB, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, Pacheco RS, Valete-Rosalino CM, Mendonça SC 2007. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101:735-737.
- [6] Pereira BAS, Alves CR 2008. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Vet Parasitol* 158:239-255.
- [7] Alexander J, Bryson K 2005. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett* 99:17-23.
- [8] McMahon-Pratt D, Alexander J 2004. Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunol Rev* 201:206-224.
- [9] Mottram JC, Coombs GH, Alexander J 2004. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr Opin Microbiol* 7:375-381.

- [10] Mottram JC, Brooks DR, Coombs GH 1998. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Curr Opin Microbiol* 1:455-460.
- [11] De Souza Leao S, Lang T, Prina E, Hellio R, Antoine JC 1995. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci* 108:3219-3231.
- [12] Pollock KG, McNeil KS, Mottram JC, Lyons RE, Brewer JM, Scott P, Coombs GH, Alexander J 2003. The *Leishmania mexicana* cysteine protease, CPB2.8, induces potent Th2 responses. *J Immunol* 170:1746-1753.
- [13] Weinheber N, Wolfram M, Harbecke D, Aebischer T 1998. Phagocytosis of *Leishmania mexicana* amastigotes by macrophages leads to a sustained suppression of IL-12 production. *Eur J Immunol* 28:2467-2477.
- [14] Cameron P, McGachy A, Anderson M, Paul A, Coombs GH, Mottram JC, Alexander J, Plevin R 2004. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. *J Immunol* 173:3297-3304.
- [15] Duboise SM, Vannier-Santos MA, Costa-Pinto D, Rivas L, Pan AA, Traub-Cseko Y, De Souza W, McMahon-Pratt D 1994. The biosynthesis, processing, and immunolocalization of *Leishmania pifanoi* amastigote cysteine proteinases. *Mol Biochem Parasitol* 68:119-132.
- [16] Traub-Cseko YM, Duboise M, Boukai LK, McMahon-Pratt D 1993. Identification of two distinct cysteine proteinase genes of *Leishmania pifanoi* axenic amastigotes using the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 57:101-115.
- [17] Alves CR, Corte-Real S, Bourguignon SC, Chaves CS, Saraiva EM 2005. *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation *in vitro*. *Exp Parasitol* 109: 38-48.

- [18] Marin-Villa M, Vargas-Inchaustegui DA, Chaves SP, Tempone AJ, Dutra JM, Soares MJ, Ueda-Nakamura T, Mendonça SC, Rossi-Bergmann B, Soong L, Traub-Cseko YM 2008. The C-terminal extension of *Leishmania pifanoi* amastigote-specific cysteine proteinase Lpcys2: a putative function in macrophage infection. *Mol Biochem Parasitol* 162:52-59.
- [19] Alves CR, Pontes de Carvalho LC, Souza AL, De Simone SG 2001. A strategy for the identification of T-cell epitopes on *Leishmania* cysteine proteinases. *Cytobios* 104:33-41.
- [20] Alves CR, Benevolo-De-Andrade TC, Alves JL, Pirmez C 2004. Th1 and Th2 immunological profile induced by cysteine proteinase in murine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 26:127-135.
- [21] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138.
- [22] Ogata K, Wodak SJ 2002. Conserved water molecules in MHC class-I molecules and their putative structural and functional roles. *Protein Engineering* 15:697-705.
- [23] Harding CV 1991. Pathways of antigen processing. *Curr Opin Immunol* 3:3-9.
- [24] Soong L, Chang CH, Sun J, Longley BJ Jr, Ruddle NH, Flavell RA, McMahon-Pratt D 1997. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol* 158:5374-5383.
- [25] Ji J, Sun J, Qi H, Soong L 2002. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am J Trop Med Hyg* 66:338-345.
- [26] Sacks D, Noben-Trauth N 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2:845-858.

[27] Hernández-Ruiz J, Becker I 2006. Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la leishmaniasis cutánea. *Salud Publica Mex* 48:430-439.

TABLES

Table I –Predicted T lymphocytes epitopes from the COOH-terminal extension from *L. (L.) amazonensis* CPB

Epitope	Amino acids sequence	Number of amino acids	Binds to H-2 haplotype (predicted)	SYFPEITHI score value
P1	KNGGGGASMI	10	D	13
P2	NGGGGASMI	9	d and k	15 / 13
P3	GGGGASMI	8	K	13
P4	MCTYSNEFCL	10	D	10
P5	CTYSNEFCL	9	D	12
P6	FCLGGGLCL	9	D	17
P7	CAPYFLGSVI	10	D	11
P8	APYFLGSVI	9	d and k	13 / 13
P9	PYFLGSVI	8	K	13

Table II – Cytokines levels in lymph node supernatants from cell cultures of infected Balb/c mice coincubated with predicted epitopes

	pg/mL				μM
	IL-4	IL-10	IL-12	INF-γ	NO
Con A	979.69±3.79	590.30±77.20	32.16±5,21	872.33±17.12	7.78±3.49
PLA	37.82±5.67	188.30±34.88	12.02±11,77	474.92±92.24	0.84±0.13
P1	ND	ND	75.00±34.65	ND	ND
P2	ND	ND	ND	15.88±3.19	ND
P4	ND	10.97±2.47	ND	49.25±20.10	ND
P5	ND	ND	ND	ND	ND
P6	ND	2.97±0.82	ND	ND	ND
P7	ND	ND	ND	ND	ND
P8	ND	ND	ND	ND	ND

Results presented are from a representative assay from three independent repetitions.

Results are presented as mean ± standard deviation values. ND – below the threshold established by control group.

Table III – Cytokine levels in lymph node supernatants from cell cultures of infected CBA mice coincubated with predicted epitopes

	pg/mL				μM
	IL-4	IL-10	IL-12	INF-γ	NO
Con A	226.84± 9.53	338.10±11.49	26.85±11.94	939.48±0.00	ND
PLA	33.67± 4.82	68.57±6,88	ND	87.06±12,23	1.39±0.96
P2	ND	ND	18.37±11.58	ND	ND
P3	ND	ND	16.44±3.25	ND	ND
P8	ND	27.46±0.74	ND	ND	ND
P9	ND	21.03±0.16	8.02±3.85	ND	ND

Results presented are from a representative assay from three independent repetitions.

Results are presented as mean ± standard deviation values. ND – below the threshold established by control group.

LEGENDS OF THE FIGURES

Figure 1 – Nucleotide (above) and amino acid (below) sequences of the CCOH-terminal extension from *L. (L.) amazonensis* CPB. Sequences are informed as 5'→3' and NH₃-terminal (Nt) → COOH-terminal (Ct), for nucleotides and amino acids, respectively.

Figure 2 – Blastogenesis of murine lymph node cells induced by predicted epitopes derived from the COOH-terminal extension of *L. (L.) amazonensis* CPB. Cell cultures from infected Balb/c (A) or CBA (B) mice were incubated for 3 days in 96-well plates with predicted epitopes (30 µg/mL), PLA (30 µg/mL) or Con A (2 µg/mL), coincubated with [³H]-thymidine (0.1 µCi/well) in the final 16h and incorporated radioactivity (related to cell proliferation) was measured in a beta-scintillation counter. Results are from a representative assay from at least three independent repeats. **p*<0.05.

Figure 3 – Percentages of CD8⁺ (A and B) and CD4⁺ cells (C and D) in murine lymph node cell cultures after incubation with predicted epitopes derived from the COOH-terminal extension of *L. (L.) amazonensis* CPB. Cell cultures from infected Balb/c (A and C) or CBA (B and D) mice were incubated for 3 days in 24-well plates with predicted epitopes (30 µg/mL), PLA (30 µg/mL) or Con A (2 µg/mL), stained with specific CD4 and CD8 antibodies conjugated to fluorophores and submitted to analysis by flow cytometry. Results are from a representative assay from at least three independent repeats. **p*<0.05.

Figure 4 – Predicted intermolecular energy (kcal/mol) of the complexes H-2/peptide by the *in silico* docking assays. Peptides P1, P2, P4, P5, P6, P7 and P8 were assayed with

H-2K^d – Balb/c mice (A), while P2, P3, P8 and P9 were assayed with H-2K^k – CBA mice (B). Control assays were performed by redocking the original cocrystallized peptides to their respective H-2 haplotype (PDB codes: 1vgk and 1zt7).

Figure 5 – Predicted number of van der Waals contacts of the complexes H-2/peptide by the *in silico* docking assays. Peptides P1, P2, P4, P5, P6, P7 and P8 were assayed with H-2K^d – Balb/c mice (A), while P2, P3, P8 and P9 were assayed with H-2K^k – CBA mice (B). Control assays were performed by redocking the original cocrystallized peptides to their respective H-2 haplotype (PDB codes: 1vgk and 1zt7).

Figure 6 – Predicted number of hydrogen bonds of the complexes H-2/peptide by the *in silico* docking assays. Peptides P1, P2, P4, P5, P6, P7 and P8 were assayed with H-2K^d – Balb/c mice (A), while P2, P3, P8 and P9 were assayed with H-2K^k – CBA mice (B). Control assays were performed by redocking the original cocrystallized peptides to their respective H-2 haplotype (PDB codes: 1vgk and 1zt7).

FIGURE 1

5' - gcaccagaccogt gatggaggagcaggtgatctgcttogataagaactgcactcaggggtgcaagaaaaccctgatcaaggcgaacgagtg
Nt- A P R P V M V E Q V I V F D K N C T Q G C K K T L I K A N E C

cacaagaacggggaggaggcgccctctatgatcaagtgcagtcgcagacgggtgacgatgtgcacgtactcgaacgaattctgcctgggaggggg
H K N G G G G A S M I K C S P Q T V T M C T Y S N E F C L G G G

ctgtgcctcgagactcctgatggaagtgcgcgccgtactttttgggctcggtcattaacacctgtcactacag -3'
L C L E T P D G K C A P Y F L G S V I N T C H Y T -Ct

FIGURE 2

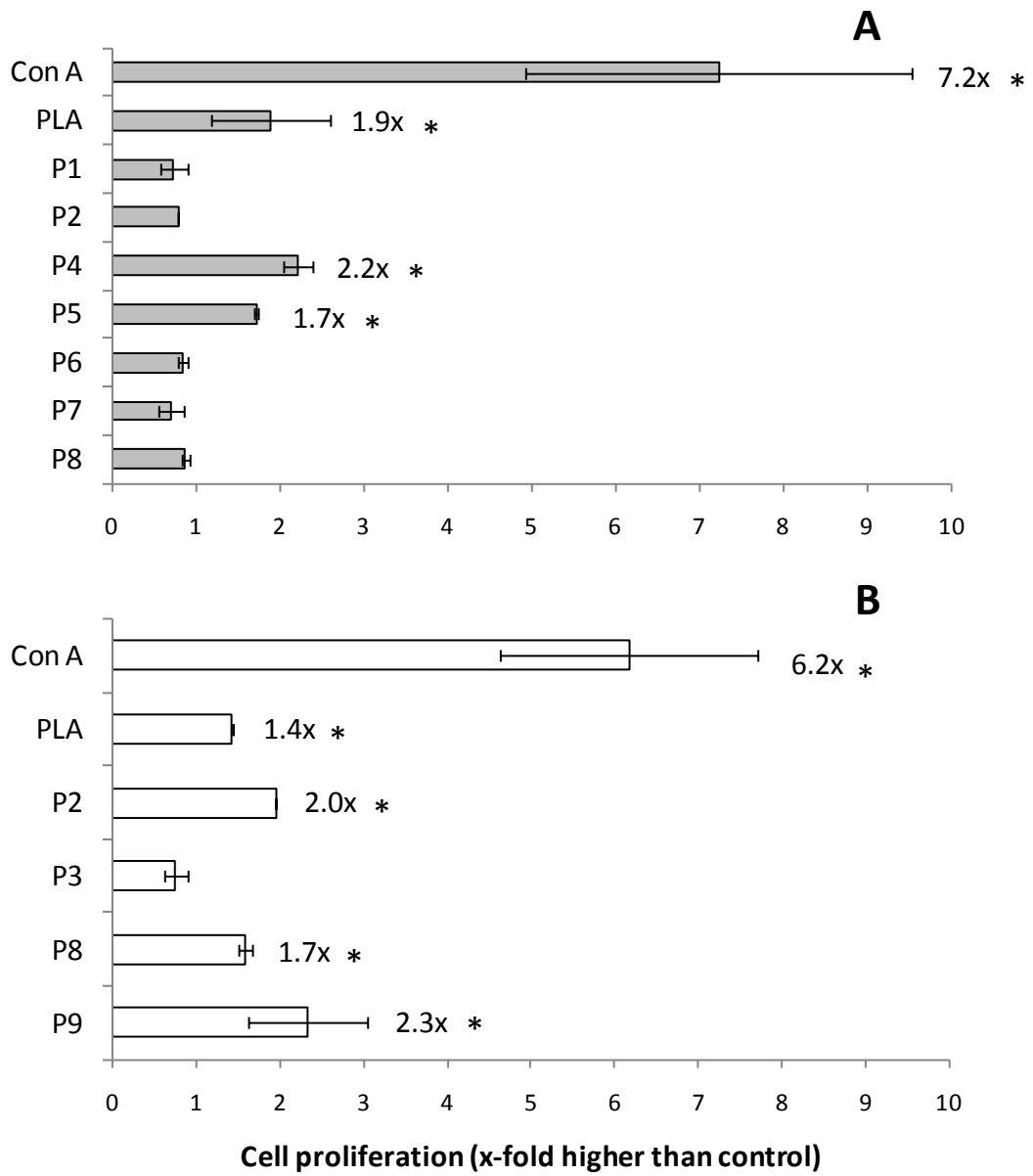


FIGURE 3

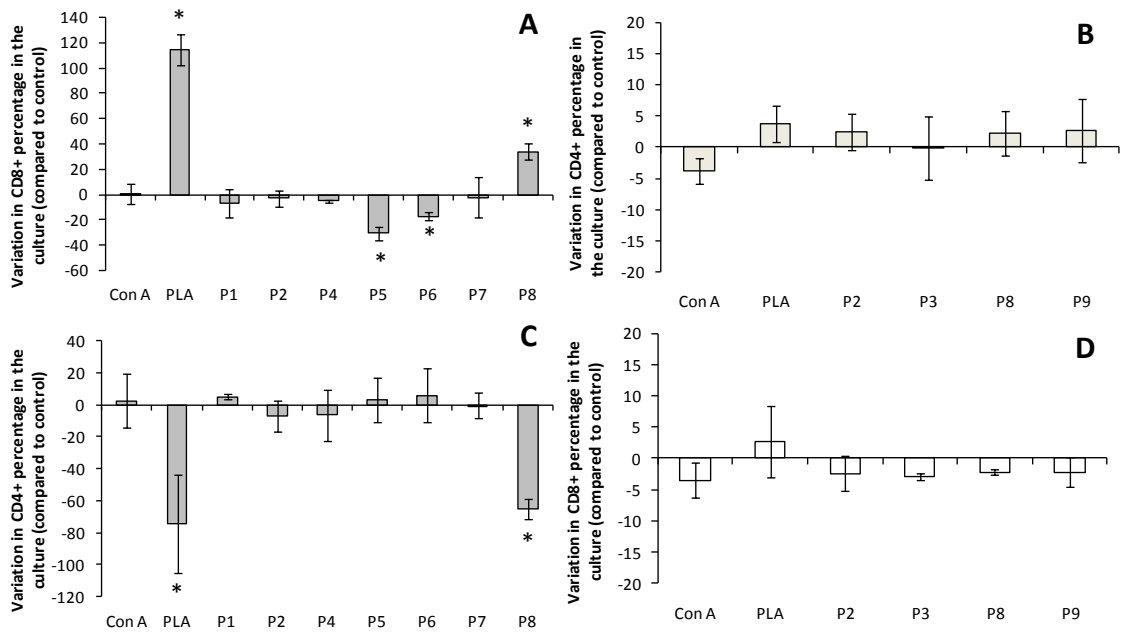


FIGURE 4

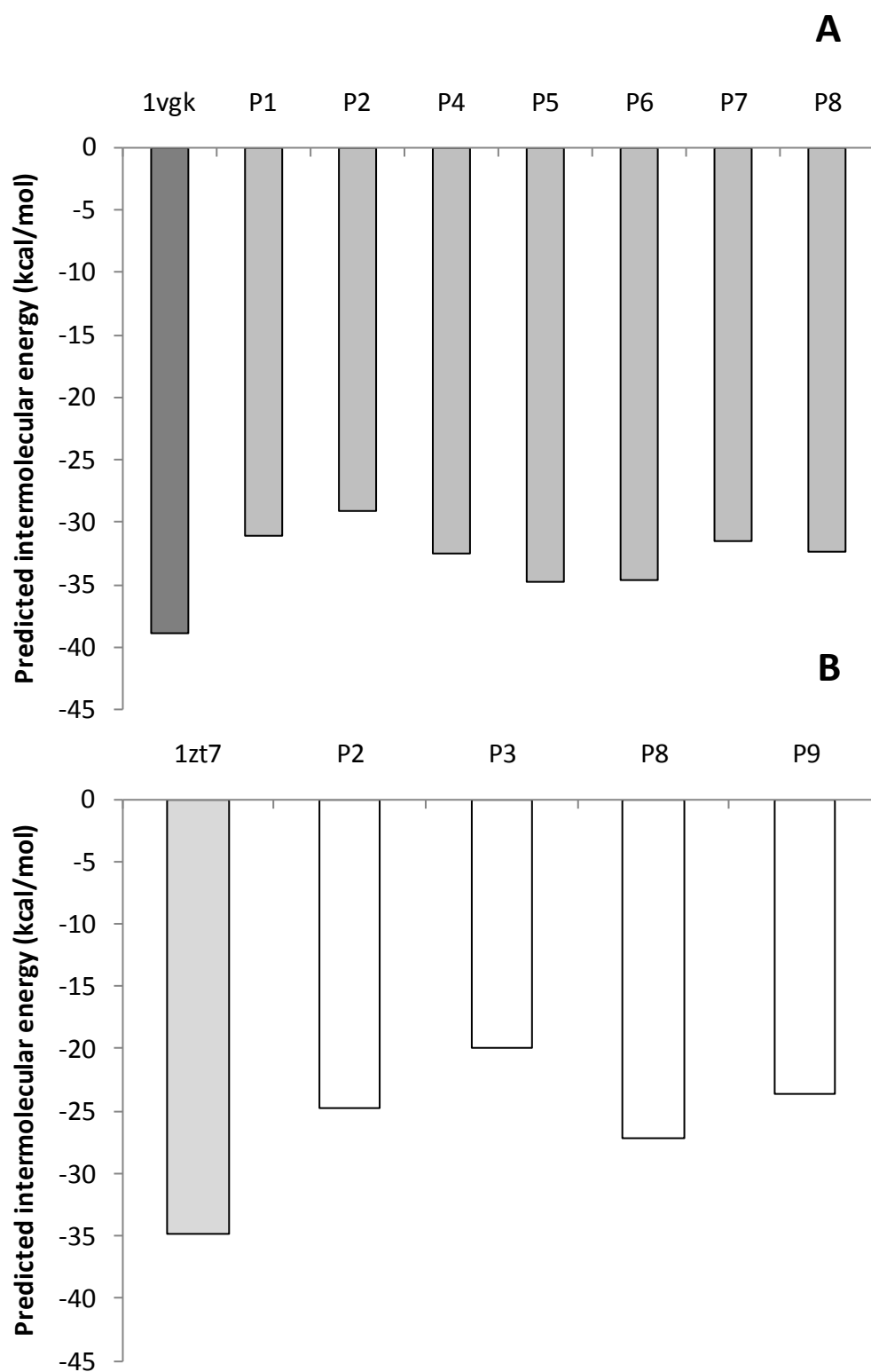


FIGURE 5

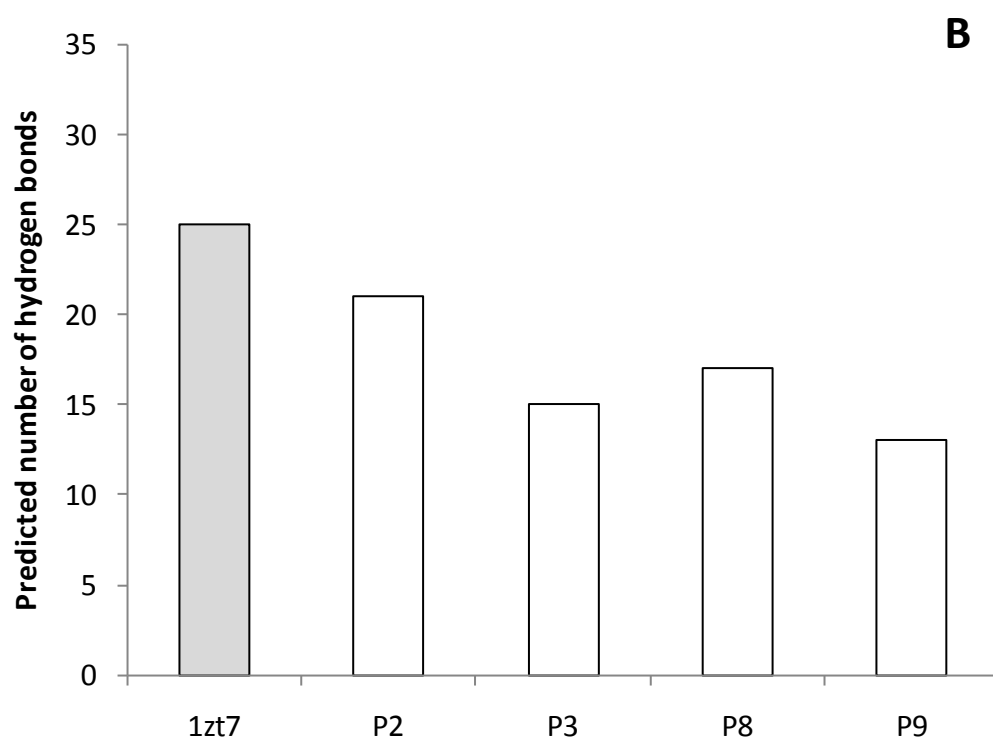
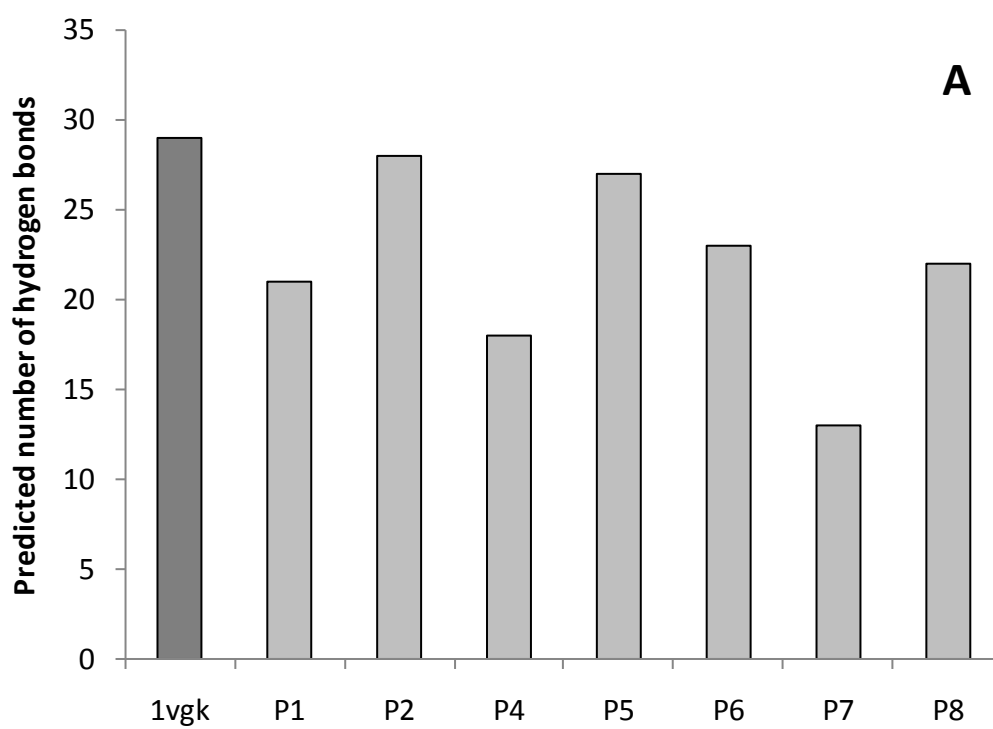


FIGURE 6

