

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
EM SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

PABLO RAFAEL SILVEIRA OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**MODULAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS E
AGRAVAMENTO DA INFECÇÃO EM MODELO MURINO DE
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR POR MOLÉCULAS DE
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

**SALVADOR-BAHIA
2010**

PABLO RAFAEL SILVEIRA OLIVEIRA

**MODULAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS E
AGRAVAMENTO DA INFECÇÃO EM MODELO MURINO DE
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR POR MOLÉCULAS DE
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho

**SALVADOR-BAHIA
2010**

PABLO RAFAEL SILVEIRA OLIVEIRA

**MODULAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS E
AGRAVAMENTO DA INFECÇÃO EM MODELO MURINO DE
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR POR MOLÉCULAS DE
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em 29/10/2010.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho

Pesquisador Titular da Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Gonçalo Moniz

Dr^a. Fabíola Cardillo

Pesquisadora Associada da Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Gonçalo Moniz

Dr^a. Milena Botelho Pereira Soares

Pesquisadora Titular da Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Gonçalo Moniz

DEDICATÓRIA

*Para a minha mãe, meu maior
exemplo de perseverança...*

*...e para a minha Natália. Um dia
teremos uma linda família.*

AGRADECIMENTOS

Ao querido Professor Lain Carvalho, por suas ótimas ideias, sua dedicação e pela condução deste trabalho.

Ao Professor Alberto Dutra, pelas longas e prazerosas caminhadas sobre os campos férteis da biologia.

À querida Professora Virgínia Silva, por todos os anos de convivência, tão importantes para a minha formação.

À grande amiga Isabela Navarro, a quem tenho uma enorme admiração e devo grande parte deste trabalho. Hoje, alguém disse na televisão algo que eu sempre quis lhe dizer: - Tudo é uma questão de ter a mente quieta, a espinha ereta e o coração tranquilo. Seja a luz!

Aos grandes amigos feitos durante os anos da iniciação científica, Thayna Meirelles e Rodrigo Feitosa. Vocês me fazem muita falta!

Ao grande amigo David Garrido, pela disponibilidade e pela ótima convivência durante o mestrado.

À Luciana França, pelo zelo com todos os membros da “bancada 05” e pela participação ativa neste trabalho.

À Viviane Rocha, pela boa convivência e pelos proveitosos conselhos.

À Thassila Pitanga e Pilar Veras, pelas boas risadas e pela amizade.

Ao amigo Felipe Miranda, por suas contribuições intelectuais.

Aos colegas do LPBI, especialmente aos amigos da “bancada 05”.

A Sérgio Vasconcelos, pelo trabalho na esterilização e pela agradável presença.

À Elivani de Jesus, pelo auxílio técnico.

À Flávia Paixão, pela competência na administração do LPBI.

Apoio financeiro:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO

*Como diria o grande Alberto (sic)
Einstein... “Nada é mais prático do que
uma boa teoria.”*

RESUMO

Em humanos, tanto *L. amazonensis* quanto *L. braziliensis* causam a leishmaniose cutânea localizada, mas, no Brasil, o desenvolvimento da leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) é exclusivamente atribuído às infecções por *L. amazonensis*. Por outro lado, a leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) está usualmente associada à *L. braziliensis*. Enquanto a LCD é caracterizada pelo elevado número de parasitos nas lesões e pela falta de resposta celular anti-*Leishmania*, a LCM é geralmente acompanhada por resposta celular intensa e baixo número de parasitos nas lesões. Portanto, é provável que diferenças espécie-específicas sejam determinantes para o desenvolvimento dos dois polos de responsividade imune nas leishmanioses cutâneas. Experimentos realizados em nosso laboratório mostraram que a imunização de camundongos BALB/c com o extrato de formas amastigotas de *L. amazonensis* (ELa) confere suscetibilidade à infecção por *L. braziliensis*. Os principais objetivos do presente estudo foram identificar e elucidar os mecanismos de ação dos fatores do ELa capazes de conferir suscetibilidade à infecção experimental por *L. braziliensis*. Para isso, o ELa foi fracionado por cromatografia líquida em coluna de troca iônica. As atividades das frações obtidas foram avaliadas quanto às suas capacidades em interferir nas funções normais de macrófagos de BALB/c, tornando-os suscetíveis à infecção cutânea causada por *L. braziliensis*. Foram preparadas quatro misturas de frações adjacentes, eluídas da coluna, que possuíam proteínas com perfis eletroforéticos na presença de dodecil sulfato de sódio e atividades proteolíticas semelhantes. Estas misturas de frações foram denominadas de frações 1, 2, 3 e 4. As frações 2, 3 e 4, e não a 1, foram capazes de agravar a doença causada por *L. braziliensis*. Após a ativação dos macrófagos com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), o ELa suprimiu a produção de óxido nítrico e das citocinas inflamatórias avaliadas (TNF- α , IL-12p70 e IL-6). De maneira oposta, o tratamento com o ELa aumentou a produção de IL-10 por macrófagos ativado por LPS. Nenhuma das frações contendo moléculas eluídas da coluna de troca iônica, ou a fração efluente da coluna, foi capaz de suprimir globalmente a produção de citocinas inflamatórias e de NO e aumentar a produção de IL-10 *in vitro*, como observado com o extrato total de amastigotas de *L. amazonensis*, após a ativação dos macrófagos por LPS. Apenas o tratamento *in vitro* com a fração 3 suprimiu a produção de TNF- α por macrófagos. A identificação e a elucidação dos mecanismos de ação dos fatores capazes de agravar a leishmaniose cutânea podem ser determinantes para o desenvolvimento de estratégias para o combate de patógenos intracelulares e também para a imunomodulação terapêutica de doenças autoimunes e alérgicas.

Palavras-chave: *Leishmania*; suscetibilidade; macrófagos.

ABSTRACT

In humans, infections with *Leishmania (Viannia) braziliensis* usually induces a intense cellular response and few lesions restricted to the skin and/or mucous membrane, while infections with *Leishmania (Leishmania) amazonensis* can cause also a very serious form of the disease, known as diffuse cutaneous leishmaniasis, in which there is a poor cellular response to the parasite and disseminated lesions on the skin of the host. Most inbred strains of mice, like the BALB/c, are susceptible to *L. amazonensis* and resistant to *L. braziliensis* infections. This parasite-related difference could result from the activity of a *L. amazonensis*-specific virulence factor. In agreement with this hypothesis, we previously demonstrated that the immunization of BALB/c mice with *L. amazonensis* amastigote extract (LaE), and not with *L. braziliensis* extract, confers susceptibility to *L. braziliensis* infection. The main objectives of this study were to identify and elucidate the mechanisms of action of the LaE factors that contribute to the enhancement of experimental cutaneous leishmaniasis. The LaE was fractioned by liquid chromatography on ion-exchange column. The collected fractions were evaluated by their ability to subvert the normal functions of macrophages, making BALB/c mice susceptible to the infection by *L. braziliensis*. The fractions 2, 3 and 4, but not the fraction 1, were able, as well as the total extract of *L. amazonensis*, to aggravate the cutaneous infection. The LaE suppressed the inflammatory cytokine production (IL-12p70, IL-6 and TNF- α) in LPS-stimulated macrophages. On the other hand, LaE increased the IL-10 production in LPS-stimulated macrophages. None of the fractions obtained by liquid chromatography on ion-exchange column, neither the effluent fraction were able to down-modulate the global production of inflammatory cytokines and NO and increase the IL-10 production in activated macrophages. The *in vitro* treatment with the fraction 3 suppressed the TNF- α production in macrophages. The identification and elucidation of the action mechanisms of the factors that aggravate cutaneous leishmaniasis may be determinant for the development of novel strategies to combat intracellular pathogens but also for therapeutic immunomodulation of autoimmune and allergic diseases.

Keywords: *Leishmania*; susceptibility; macrophages.

LISTA DE TABELA E FIGURAS

		Página
Tabela 1	Cromatografia líquida em coluna de troca iônica do extrato de amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	43
Figura 1	Análise zimográfica dos extratos de amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> (ELa) e <i>Leishmania braziliensis</i> (ELb)	42
Figura 2	Perfil (cromatograma) da purificação do extrato de amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> (ELa) através de cromatografia líquida em coluna de troca iônica	44
Figura 3	Caracterização das frações do extrato de amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> (ELa) através de eletroforese em gel de poliacrilamida e detecção de atividade proteolítica	46
Figura 4	Caracterização das frações agrupadas do extrato de amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> (ELa) através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio seguida de coloração para proteína (Azul de Coomassie) e detecção de atividade proteolítica (Zimograma)	47
Figura 5	Efeito das frações purificadas do extrato de amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> (ELa) em modelo murino de leishmaniose tegumentar	49
Figura 6	Produção de citocinas em macrófagos tratados com o extrato de amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> (ELa)	50
Figura 7	Produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos tratados com o extrato de amastigotas <i>Leishmania amazonensis</i> (ELa)	51
Figura 8	Modulação da produção de citocinas pelo extrato de amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> (ELa) em macrófagos ativados por LPS	53
Figura 9	Modulação da produção de óxido nítrico (NO) pelo extrato de amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> (ELa) em macrófagos ativados por LPS	54
Figura 10	Modulação da produção de citocinas pelas frações purificadas do extrato de amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> (ELa) em macrófagos ativados por LPS	56

Figura 11	Modulação da produção de óxido nítrico (NO) pelas frações purificadas do extrato de amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> (ELa) em macrófagos ativados por LPS	57
-----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
C3b	Proteína do complemento 3b
C3bi	Proteína do complemento 3b inativa
CPA	Protease homóloga à Catepsina A
CPB	Protease homóloga à Catepsina B
CPC	Protease homóloga à Catepsina C
CR3	Receptor do completo tipo 3
DCs	Células dendríticas
DMEM	Meio de Dulbecco modificado por Eagle
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GIPL	Glicoinositolfosfolipídio
gp63	Glicoproteína 63 kDa
IFN- γ	Interferon- <i>gamma</i>
IL-	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase
JNK	Cinase c-Jun N-terminal
ELa	Extrato de <i>Leishmania amazonensis</i>
LACK	Proteína homóloga ao receptor da cinase C ativada
ELb	Extrato de <i>Leishmania braziliensis</i>
LCD	Leishmaniose cutâneo-difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCM	Leishmaniose cutâneo-mucosa
LT	Leishmaniose tegumentar
LPG	Lipofosfoglicano

LPS	Lipopolissacarídeo
LV	Leishmaniose visceral
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MHC-I	Complexo de histocompatibilidade principal-I
NF κ B	Fator nuclear κ B
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PE	Ficoeritrina
SFB	Soro fetal bovino
TGF- β	Fator de crescimento e transformação- <i>beta</i>
Th1	Célula T auxiliar do tipo 1
Th2	Célula T auxiliar do tipo 2
TLR-	Receptor do tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral- <i>alfa</i>

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Aspectos gerais das leishmanioses	16
1.1.1 Transmissão e estabelecimento da <i>Leishmania</i> no hospedeiro definitivo	16
1.1.2 Formas clínicas das leishmanioses	17
1.1.3 Epidemiologia das leishmanioses	18
1.1.4 Controle e tratamento das leishmanioses	18
1.2 Leishmaniose tegumentar americana	19
1.3 Modelos murinos de leishmaniose tegumentar	20
1.4 Subversão da imunidade inata por <i>Leishmania</i> spp.	22
1.4.1 Células alvo	22
1.4.2 Modulação da atividade microbicida	22
1.4.3 Modulação da produção de citocinas	23
1.5 Principais moléculas de <i>Leishmania</i> spp. com atividade imunomoduladora	24
1.5.1 O amastigota como alvo de estudos sobre fatores de virulência	24
1.5.2 Lipofosfoglicano (LPG)	25
1.5.3 Proteína homóloga ao receptor da cinase C ativada (LACK)	25
1.5.4 Proteases	26
1.6 Agravamento da leishmaniose tegumentar por moléculas de <i>Leishmania</i>	28
2. HIPÓTESE	30
3. OBJETIVOS	31
3.1 Geral	31

3.2 Específicos	31
4. JUSTIFICATIVA	32
5. MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1 Animais	33
5.2 Parasitos	33
5.3 Extratos de <i>Leishmania</i>	34
5.4 Fracionamento do ELa	34
5.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida e detecção de atividade proteolítica	35
5.6 Agrupamento das frações do ELa	36
5.7 Quantificação de proteínas	37
5.8 Tratamento de camundongos com ELa e frações	37
5.9 Modelo murino de leishmaniose cutânea	38
5.10 Quantificação de carga parasitária	38
5.11 Obtenção e cultivo de macrófagos peritoneais residentes	39
5.12 Dosagem de citocinas	40
5.13 Detecção da produção de nitrito (NO ₂ ⁻)	40
5.14 Análises estatísticas	41
6. RESULTADOS	42
6.1 Análise zimográfica dos extratos de <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Leishmania braziliensis</i>	42
6.2 Fracionamento do ELa	43
6.3 Caracterização das frações do ELa através de eletroforese em gel de poliacrilamida e detecção de atividades proteolíticas	44
6.4 Caracterização das frações do ELa agrupadas de acordo com similaridades de perfis eletroforéticos na presença de dodecil sulfato de sódio e com o	47

compartilhamento de atividades proteolíticas (frações 1, 2, 3 e 4)	
6.5 Avaliação das atividades das frações do <i>ELa</i> em modelo murino de leishmaniose tegumentar	48
6.6 Efeitos do <i>ELa</i> sobre macrófagos peritoneais de BALB/c	50
6.6.1 Modulação da produção basal de citocinas e nitrito pelo <i>E/a</i>	50
6.6.2 Modulação da produção de citocinas e nitrito pelo <i>ELa</i> em macrófagos ativados por LPS	51
6.7 Atividades das frações purificadas do <i>ELa</i> em macrófagos ativados por LPS	54
7. DISCUSSÃO	58
8. CONCLUSÕES / SUMÁRIO DE RESULTADOS	67
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais das leishmanioses

1.1.1 Transmissão e estabelecimento da *Leishmania* no hospedeiro definitivo

As leishmanioses constituem um complexo de doenças causadas por cerca de 20 protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania* (DESJEUX, 2004, 2001; HERWALDT, 1999). Estas enfermidades apresentam um caráter antroponótico e são transmitidas aos hospedeiros vertebrados através da picada do vetor flebotomíneo (Diptera: Psychodidae) fêmea infectado, que, ao realizar o repasto sanguíneo, inocula na derme do hospedeiro, juntamente com a saliva, as formas promastigotas flageladas de *Leishmania* (SACKS & KAMHAWI, 2001). Após a transferência para o hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos, células dendríticas (PRINA *et al.*, 2003) ou, como recentemente evidenciado, por neutrófilos (JOHN & HUNTER, 2008; LASKAY *et al.*, 2008; PETERS *et al.*, 2008). No modelo de interação *Leishmania*-macrófago, as formas promastigotas metacíclicas (SACKS & PERKINS, 1984), capazes de escapar da lise mediada pelo complemento (SACKS & DA-SILVA, 1987), são fagocitadas por macrófagos. Dentro do vacúolo parasitóforo, as formas promastigotas transformam-se em amastigotas e, após replicarem-se, infectam outras células, disseminando a infecção (MURRAY *et al.*, 2005). De outro modo, de acordo com o modelo mais recente de interação *Leishmania*-neutrófilo-macrófago, as primeiras células que chegam ao sítio da infecção, atraídas por moléculas presentes na saliva do inseto

vetor, são os neutrófilos, que funcionam como pontes entre os parasitos e as células hospedeiras finais, os macrófagos (PETERS & SACKS, 2009). Após o estabelecimento da *Leishmania* nos macrófagos, o sucesso ou o fracasso da infecção dependerá (i) do perfil imunológico/genético do hospedeiro, associado ao tipo de resposta de células T (CASTELLUCCI *et al.*, 2006; BLACKWELL, 1999; LARA *et al.*, 1991; PETZL-ERLER *et al.*, 1991), e (ii) da espécie de *Leishmania* envolvida, associada à sua capacidade de interagir com células dendríticas (BREWIG *et al.*, 2009; CAMPOS *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2008), produzindo manifestações clínicas variadas.

1.1.2 Formas clínicas das leishmanioses

As formas clínicas das leishmanioses são, basicamente, visceral (LV) e tegumentar (LT). A forma visceral é potencialmente fatal, acometendo o sistema retículoendotelial, envolvendo baço, fígado, medula óssea e linfonodos (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995). A LT apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, que variam desde a formação de lesões localizadas autorresolutivas até a formação de lesões desfigurantes. De modo geral, a LT em humanos é caracterizada pela formação de lesões cutâneas únicas ou múltiplas, sendo bastante frequentes úlceras indolores, com bordo elevado e fundo necrótico, tendendo para a cura espontânea. Primariamente, a LT compromete a pele, mas a linfadenopatia regional é comum, podendo preceder o aparecimento de lesões cutâneas (BARRAL *et al.*, 1995b).

1.1.3 Epidemiologia das leishmanioses

Ciclos de transmissão de *Leishmania* foram encontrados em todos os continentes, exceto na Oceania, ocorrendo em ambientes quentes e úmidos de regiões tropicais e subtropicais até em regiões temperadas no Mediterrâneo e estepes na Rússia (GRIMALDI Jr. *et al.*, 1989; LAINSON & SHAW, 1977). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, aproximadamente 370 milhões de pessoas vivem sob risco de infecção em todo o mundo. As leishmanioses atingem cerca de 2 milhões de pessoas, causando aproximadamente 60 mil mortes por ano (WHO, 2002). Cerca de 90% dos casos de LT concentram-se em países como Afeganistão, Paquistão, Síria, Arábia Saudita, Iran, Brasil e Peru. No caso da LV, aproximadamente 90% das ocorrências são registradas na Índia, em Bangladesh, no Nepal, no Sudão e no Brasil (MURRAY *et al.*, 2005; YAMEY & TOREELE, 2002).

1.1.4 Controle e tratamento das leishmanioses

Apesar de muitos esforços, as estratégias aplicadas para o controle e o tratamento das leishmanioses avançaram pouco nas últimas décadas. Atualmente, os principais medidas para o controle da doença visam (i) a eliminação dos vetores e (ii) dos reservatórios e (iii) o desenvolvimento/melhoramento de testes diagnósticos precisos para detecção de casos ativos e identificação de falhas no tratamento (CHAPPUIS *et al.*, 2007; KROEGER *et al.*, 2002). O diagnóstico precoce, combinado a um tratamento eficaz, é essencial para o paciente, porém, nas regiões onde ocorrem ciclos zoonóticos de transmissão, eles têm impacto limitado para o controle da ocorrência de novos casos, se os principais reservatórios e os insetos vetores

não forem controlados (DAVIES *et al.*, 2003). De modo geral, as drogas mais utilizadas para os tratamentos das leishmanioses são muito tóxicas para o paciente, além de casos de resistência a elas ocorrerem cada vez mais frequentemente. Por isso, drogas menos nocivas ao paciente e mais eficientes para o controle dos parasitos, como a miltefosina, a paromomicina e a anfotericina B lipossomal, estão gradualmente substituindo os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B convencional (GUERIN *et al.*, 2002). Analisando todas essas dificuldades, a Organização Mundial da Saúde considera o desenvolvimento de uma vacina como alternativa principal para o controle das leishmanioses (WHO, 2002). Porém, até o momento, nenhuma das diversas composições e protocolos de imunização testados foi capaz de evitar o desenvolvimento da doença de maneira eficaz (KHAMESIPOUR *et al.*, 2005).

1.2 Leishmaniose tegumentar americana

A leishmaniose tegumentar americana está entre uma das endemias de maior importância para a saúde pública brasileira, principalmente devido à sua ampla distribuição pelo território nacional e à ocorrência de formas clínicas graves, além das dificuldades referentes ao diagnóstico e tratamento.

Nas Américas, existem pelo menos onze espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras da doença em humanos, sendo que, no Brasil, a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* são as espécies mais amplamente distribuídas (COSTA, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2004). O curso da infecção cutânea causada por *L. braziliensis* é geralmente irregular e crônico, com tendência para a cura espontânea. Em geral, a infecção por *L. amazonensis* produz

no homem lesões ulceradas simples e limitadas, com numerosos parasitos nos bordos da lesão. Tanto a *L. amazonensis* quanto a *L. braziliensis* causam a leishmaniose cutânea localizada (LCL) (CARVALHO *et al.*, 1995), mas, no Brasil, o desenvolvimento da leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) é exclusivamente atribuído às infecções por *L. amazonensis* (SILVEIRA *et al.*, 2009). Por outro lado, a leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) está usualmente associada à *L. braziliensis* (MARSDEN, 1990). Enquanto a LCD é caracterizada pelo elevado número de parasitos nas lesões e pela falta de resposta celular anti-*Leishmania*, a LCM é geralmente acompanhada por intensa resposta celular e baixo número de parasitos nas lesões. Portanto, é provável que diferenças espécie-específicas sejam determinantes para o desenvolvimento dos dois polos de responsividade imune nas leishmanioses cutâneas (SILVEIRA *et al.*, 2009; BARRAL *et al.*, 1995a; CARVALHO *et al.*, 1985).

1.3 Modelos murinos de leishmaniose tegumentar

Os estudos com modelos experimentais murinos permitiram diversos avanços no entendimento da imunopatogênese das leishmanioses. As linhagens de camundongos existentes com perfis imunológicos distintos, a possibilidade de modificações genéticas dos animais, e a similaridade imunológica dos camundongos com o homem tornam esses modelos ferramentas importantes para a elucidação dos mecanismos de relação parasito-hospedeiro em diversas doenças (KAYE *et al.*, 1991). Os modelos experimentais utilizados em estudos sobre a leishmaniose tegumentar esclareceram a importância dos linfócitos T CD4⁺ na determinação dos quadros de resistência ou suscetibilidade à *Leishmania* (MOCCI & COFFMAN, 1995)

e, de modo ainda mais relevante, contribuíram para o entendimento de mecanismos gerais das respostas imunes (COFFMAN *et al.*, 1991). Camundongos geneticamente modificados, incapazes de ativar células T CD4⁺, quando infectados com *L. amazonensis*, não apresentaram lesões, sugerindo que a formação de úlceras e a destruição tecidual presentes nos camundongos normais estão relacionadas à ativação desse tipo celular (TERABE *et al.*, 2000; TERABE *et al.*, 1999).

A linhagem BALB/c é a mais utilizada em estudos sobre os mecanismos imunopatológicos das leishmanioses. Nestes camundongos, a depender da espécie de *Leishmania* utilizada na infecção, a doença pode tornar-se sistêmica e causar a morte dos animais. Modelos amplamente aceitos demonstram que a suscetibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *L. major* está associada às células T auxiliares do tipo 2 (Th2), produtoras de IL-4 e IL-10, enquanto a resistência apresentada por camundongos da linhagem C57Bl/6 está relacionada às células T auxiliares do tipo 1 (Th1), produtoras de IFN- γ (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002; SOONG *et al.*, 1997).

De modo geral, as linhagens de camundongos apresentam um aparato imune capaz de destruir rapidamente a *L. braziliensis*, produzindo uma forma benigna da doença, que é resolvida em poucas semanas (DeKREY *et al.*, 1998). Por outro lado, a espécie *L. amazonensis* causa uma doença grave na maioria das linhagens de camundongos (ALMEIDA *et al.*, 1996). Diversos estudos (JI *et al.*, 2005; PINHEIRO *et al.*, 2005; JI *et al.*, 2003; BARRAL-NETTO *et al.*, 1992) têm demonstrado que o perfil de suscetibilidade à *L. amazonensis* apresenta grande complexidade, com o envolvimento de células regulatórias, produtoras de TGF- β e IL-10.

1.4 Subversão da imunidade inata por *Leishmania* spp.

1.4.1 Células alvo

Células dendríticas e macrófagos são os alvos principais da infecção por *Leishmania* (ARGUETA-DONOHUÉ *et al.*, 2008), porém, apesar de bastante relacionadas ontogeneticamente, seus papéis na iniciação e propagação das respostas imunes contra a *Leishmania* são distintos. Diversas evidências sugerem que a *Leishmania* pode suprimir a produção de IL-12 em macrófagos (BELKAID *et al.*, 1998; CARRERA *et al.*, 1996; REINER & LOCKSLEY, 1995), mas não em células dendríticas (GORAK *et al.*, 1998; VON STEBUT *et al.*, 1998, 2000; KONECNY *et al.*, 1999; MAROVICH *et al.*, 2000). Todavia, os detalhes moleculares desta modulação diferencial ainda não foram completamente estabelecidos.

Diversos estudos foram conduzidos para compreender como as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* são capazes de infectar e suprimir eventos de sinalização intracelular nas células-alvo (revisado por KIMA, 2007). De modo geral, nos estágios iniciais da infecção (JI *et al.*, 2003), parasitos do gênero *Leishmania* são capazes de interferir nas principais funções dos macrófagos, como: atividade microbicida, produção de citocinas, apresentação de antígenos e ativação de células T (MATTE & OLIVIER, 2002; RACOOSIN & BEVERLEY, 1997).

1.4.2 Modulação da atividade microbicida

Evidências produzidas em modelos *in vivo* e *in vitro* mostram que a atividade leishmanicida de macrófagos é mediada por espécies reativas do nitrogênio,

produzidas inicialmente por reação envolvendo o óxido nítrico (NO) (SOLBACH & LASKAY, 2000; JORENS *et al.*, 1995). Em macrófagos, a produção de NO é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (iNOS), que é induzida por estímulos como IFN- γ e TNF- α (GREGORY & OLIVIER, 2005; LIEW *et al.*, 1990). A importância do NO para a destruição da *Leishmania* foi demonstrada pelo aumento do número de parasitos em macrófagos, após a utilização de antagonistas de NO (STENGER *et al.*, 1995; EVANS *et al.*, 1993). Wei e colaboradores (1995) mostraram que o NO é crucial para a eliminação da *Leishmania*, visto que, diferentemente dos animais normais, camundongos que não expressam a iNOS são suscetíveis à infecção por *L. major*. Como amplamente evidenciado, o óxido nítrico (NO) tem um papel significativo em limitar as infecções por *Leishmania* (BOGDAN *et al.*, 2000; MURRAY & NATHAN, 1999). No entanto, há indícios de que as formas amastigotas desse parasito podem impedir a produção de NO em macrófagos (GREGORY & OLIVIER, 2005; BALESTIERI *et al.*, 2002).

1.4.3 Modulação da produção de citocinas

A secreção de IL-1 em resposta ao estímulo por LPS é inibida em macrófagos após a infecção por *L. major* e *L. donovani* (REINER, 1987). A infecção *in vitro* por *L. donovani* também suprime a produção de TNF- α em macrófagos (DESCOTEAUX & MATLASHEWSKI, 1989). Ao contrário do que foi evidenciado *in vitro*, Matte & Olivier (2002) observaram aumentos nas produções de IL-1 β e TNF- α após a infecção *in vivo* com *L. major*. A citocina IL-12 tem um papel crucial na regulação da resposta imune celular. A IL-12 participa da ativação de linfócitos T e induz a produção de IFN- γ por essas células (Th1), que por sua vez aumentam a capacidade microbicida

de macrófagos. Como documentado por diversos estudos, *L. major* (BELKAID *et al.*, 1998; CARRERA *et al.*, 1996; REINER *et al.*, 1994) e *L. mexicana* (WEINHEBER *et al.* 1998) são capazes de inibir a produção de IL-12 em macrófagos.

1.5 Principais moléculas de *Leishmania* spp. com atividade imunomoduladora

1.5.1 O amastigota como alvo de estudos sobre fatores de virulência

Diversos fatores de virulência de *Leishmania* já foram identificados e seus papéis na relação parasito-hospedeiro estão sendo desvendados. Porém, a maioria dos estudos sobre a modulação do sistema imune do hospedeiro avalia moléculas preferencialmente expressas no estágio promastigota, sendo poucos os trabalhos realizados com moléculas expressas por amastigotas. No entanto, a forma amastigota é responsável pela disseminação da infecção no hospedeiro vertebrado, penetrando e sobrevivendo nos macrófagos (PINTO *et al.*, 2000; RAFATI *et al.*, 1997; BEYROLT *et al.*, 1997). Portanto, é importante determinar o papel de moléculas exclusiva ou preferencialmente expressas nesse estágio, visto que elas podem ser requeridas para a sobrevivência intracelular do parasito, representando alvos estratégicos para o controle da infecção (McMAHON-PRATT *et al.*, 1998).

1.5.2 Lipofosfoglicano (LPG)

O LPG é encontrado na superfície de promastigotas de todas as espécies de *Leishmania* descritas até o momento (TURCO *et al.*, 2001). Há evidências de que o LPG é crucial para a ligação das formas promastigotas ao epitélio do intestino do mosquito vetor (DAVIES *et al.*, 1990), atua como receptor para a fagocitose pelas células hospedeiras (SACKS, 1989), é capaz de ativar a via de sinalização do TLR-2 (DE VEER *et al.*, 2003) e, pela mesma via TLR-2, aumenta a produção de IFN- γ e TNF- α em células NK (BECKER *et al.*, 2003). Além disso, o LPG está envolvido na proteção das promastigotas contra a lise no fagolisossomo (SPATH *et al.* 2003) e na supressão da produção de NO em macrófagos (PROUDFOOT *et al.*, 1996). Argueta-Donohué e colaboradores (2008) mostraram que o LPG purificado de promastigotas de *L. mexicana* é capaz de suprimir a produção de IL-12 em monócitos, e não em células dendríticas, através da inibição da translocação do NF κ B (fator nuclear κ B) para o núcleo.

1.5.3 Proteína homóloga ao receptor da cinase C ativada (LACK)

A proteína LACK produzida por *Leishmania* também é capaz de modular a resposta imune do hospedeiro definitivo. Launois e colaboradores (1997) mostraram que, durante a infecção de camundongos BALB/c por *L. major*, a expressão da proteína LACK promove a produção de IL-4 por células T V β 4V α 8CD4⁺. A depleção das células T específicas para a proteína LACK diminui a produção de IL-4, seguido pelo desenvolvimento de uma resposta Th1 protetora (SCHILLING & GLAICHENHAUS, 2001; JULIA *et al.*, 1996).

1.5.4 Proteases

Estudos em bioquímica e biologia molecular parasitárias têm focado suas atenções em proteases que são cruciais para a patogênese e para o ciclo de vida de diversos protozoários parasitas (revisado por MCKERROW *et al.*, 1993). Essas enzimas estão envolvidas na nutrição do parasito (ROSENTHAL, 1999), invasão de células hospedeiras e tecidos (ROGGWILLE *et al.*, 1996; BRAUN-BRETON *et al.*, 1992) e modificação de proteínas do hospedeiro, em favor da sobrevivência parasitária (BURLEIGH *et al.*, 1997). Algumas proteases de *Leishmania* vêm sendo bastante estudadas e suas importâncias foram confirmadas pela demonstração de que inibidores específicos para essas enzimas reduzem a progressão da lesão leishmaniótica (SAJID & MCKERROW, 2002). A maioria das proteases de *Leishmania* é armazenada nos megassomos, estruturas encontradas nas formas amastigotas do parasito (DUBOISE *et al.*, 1994; PUPKIS *et al.*, 1986).

A gp63 (glicoproteína de 63 kDa ou leishmaniolisina) é uma metalo-protease crucial para a virulência de diversas espécies de *Leishmania*, como *L. major*, *L. mexicana*/*L. amazonensis*, e *L. donovani* (JOSHI *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2000; JOSHI *et al.*, 1998; SEAY *et al.*, 1996; WILSON *et al.*, 1989). Essa protease é capaz de clivar o C3b (para C3bi) na membrana das formas promastigotas, inibindo a lise mediada pelo complemento e promovendo, através dos receptores CR3, a fagocitose do parasito pelo macrófago (BRITTINGHAM *et al.*, 1995). A secreção da gp63 pela *Leishmania* facilita a migração e a disseminação das formas promastigotas pelo tecido através da degradação de componentes da matriz extracelular, como a fibronectina (MCGWIRE *et al.*, 2003). A gp63 também pode clivar moléculas de MHC classe I e CD4, limitando as respostas de células T

(GARCIA *et al.*, 1997; HEY *et al.*, 1994), além de ser capaz de suprimir a produção de fatores envolvidos na ativação de macrófagos (CORRADIN *et al.*, 1999).

Parasitas do gênero *Leishmania*, particularmente as espécies do complexo *L. mexicana*, expressam grandes quantidades das cisteíno-proteases CPA (protease homóloga à catepsina A), CPB (protease homóloga à catepsina B) e CPC (protease homóloga à catepsina C). Essas enzimas são expressas predominantemente pelas formas amastigotas do parasito (MOTTRAM *et al.*, 2004; MOTTRAM *et al.*, 1997). O papel de cada uma delas foi estudado e aparentemente apenas a enzima CPB é crucial para o estabelecimento do parasito no hospedeiro definitivo (BART *et al.*, 1997; MOTTRAM *et al.*, 1996; SOUZA *et al.*, 1994). A infecção com *L. mexicana* nocauteada para o gene que codifica a enzima CPB (*cpb*^{-/-}), ao contrário da infecção com o parasito selvagem, produz lesões cutâneas atenuadas em camundongos BALB/c. A proteção observada foi correlacionada com a modificação da resposta Th2 para uma resposta Th1 protetora (FRAME *et al.*, 2000; ALEXANDER *et al.*, 1998). Estudos mostram que a supressão da resposta Th1 pela CPB ocorre através da ação direta da enzima, que é capaz de degradar componentes envolvidos na produção de IL-12, como NFκB e proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) (CAMERON *et al.*, 2004; MOTTRAM *et al.*, 2004; BAXBAUM *et al.*, 2003).

As serino-proteases são encontradas em diversos organismos e participam de um vasto número de fenômenos biológicos (RAWLING & BARRET, 1994). Por exemplo, foi demonstrado que serino-proteases expressas por merozoítos de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium chabaudi* são capazes de digerir proteínas da membrana plasmática de eritrócitos, facilitando a entrada do parasito nessas células (ROGGWILLE *et al.*, 1996; BRAUN-BRETON *et al.*, 1992). Andrade e colaboradores (1998) identificaram pela primeira vez uma serino-protease (serino-oligopeptidase B)

de *Leishmania* com características bioquímicas similares às demonstradas por uma oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi*, envolvida no processo de invasão da célula hospedeira (BURLEIGH & ANDREWS, 1995). De acordo com Almeida-Campos e Horta (2000), a oligopeptidase B de *Leishmania* pode mediar a ativação de leishporinas, que são proteínas capazes de degradar a membrana de macrófagos, facilitando a invasão do parasito. Outras serino-proteases de *L. amazonensis* (MORGADO-DÍAZ *et al.*, 2005; SILVA-LOPEZ *et al.*, 2005; SILVA-LOPEZ *et al.*, 2004) e *L. donovani* (CHOUDHURY *et al.*, 2009, 2010) foram identificadas e caracterizadas, porém a importância de cada uma delas para a sobrevivência do parasito e/ou para a relação parasito-hospedeiro ainda não foi completamente elucidada. No entanto, há fortes indícios de que essa classe enzimática é crucial para a sobrevivência da *Leishmania*, visto que o tratamento com inibidores específicos de serino-proteases diminuiu significativamente a viabilidade e induziu alterações morfológicas drásticas em formas promastigotas de *L. amazonensis* (SILVA-LOPEZ *et al.*, 2007).

1.6 Agravamento da leishmaniose tegumentar por moléculas de *Leishmania*

Estudos experimentais mostraram que a imunização de camundongos com o extrato total de formas promastigotas de *L. major*, sem a presença de adjuvantes, é capaz de agravar a infecção homóloga (BOGDAN *et al.*, 1990; LIEW *et al.*, 1985). Dados obtidos por Kenney e colaboradores (1999) mostraram que a imunização de macacos rhesus (*Macaca mulata*) com promastigotas mortos de *L. amazonensis* também agravou a infecção homóloga. A administração do extrato total de formas promastigotas de *L. amazonensis* é capaz de agravar a infecção homóloga em

camundongos BALB/c (PINHEIRO *et al.*, 2005). Os componentes do extrato de *L. amazonensis* envolvidos no agravamento da doença ainda não são completamente conhecidos, porém há indícios de que cisteíno-proteases, serino-proteases e/ou LPG são fatores-chave para a ocorrência do fenômeno (DE MATOS-GUEDES *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2007). Experimentos realizados em nosso laboratório (SILVA *et al.*, submetido para publicação) mostraram que o tratamento de camundongos BALB/c com o extrato de formas amastigotas de *L. amazonensis* (ELa), e não com extrato de formas amastigotas de *L. braziliensis* (ELb), confere suscetibilidade à infecção por *L. braziliensis*. Esse efeito foi associado à ação de IL-4, já que o ELa não é capaz de agravar a doença em camundongos BALB/c que não expressam essa citocina. Além disso, foi demonstrado que a atividade do ELa é parcialmente inibida pela utilização de inibidores irreversíveis de proteases.

2. HIPÓTESE

O fracionamento cromatográfico do extrato aquoso de formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*, as quais expressam fatores espécie-específicos capazes de modular a resposta imune de camundongos BALB/c, e o teste da atividade biológica das frações obtidas *in vivo* e *in vitro*, são procedimentos relevantes para o estudo desses fatores.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar as capacidades de frações cromatográficas de extrato aquoso de amastigotas de *Leishmania amazonensis* em interferir na produção de citocinas e NO por macrófagos *in vitro* e em agravar a infecção leishmaniótica e parcialmente caracterizar essas frações.

3.2 Específicos

- i. Detectar atividades proteolíticas nos extratos de amastigotas de *L. amazonensis* e de *L. braziliensis*
- ii. Obter frações do ELa contendo diferentes proteínas/proteases de e caracterizá-las parcialmente
- iii. Investigar a participação das frações com proteínas/proteases do ELa no agravamento da infecção por *Leishmania braziliensis* em camundongos BALB/c
- iv. Avaliar a capacidade das frações com proteínas/proteases do ELa em modular a produção de citocinas e NO por macrófagos murinos não ativados e ativados por lipopolissacarídeo bacteriano

4. JUSTIFICATIVA

A identificação e a elucidação dos mecanismos de ação dos fatores capazes de agravar a infecção por *Leishmania* podem ser importantes para o desenvolvimento de estratégias para o combate da infecção leishmaniótica, e mesmo de outros patógenos intracelulares, e também para a imunomodulação terapêutica de doenças autoimunes e alérgicas. Estudos acerca da(s) molécula(s) de *L. amazonensis* envolvida(s) no agravamento da infecção leishmaniótica também podem ser importantes para a elucidação dos mecanismos causadores da leishmaniose cutâneo-difusa.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Camundongos (*Mus musculus*) da linhagem BALB/c, com 6 a 12 semanas de idade, obtidos no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (Fundação Oswaldo Cruz, Bahia, Brasil), foram mantidos com suprimento de dieta equilibrada para roedores e água *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo comitê institucional de ética em uso de animais de experimentação.

5.2 Parasitos

As infectividades das cepas de *L. amazonensis* (MHOM/Br88/Ba125) e *L. braziliensis* (MHOM/Br/96/H3456) foram mantidas por passagens regulares em camundongos BALB/c e hamsters Golden (*Mesocricetus auratus*), respectivamente. As formas promastigotas, derivadas de amastigotas teciduais, foram cultivadas sob condições estéreis a 24° C em meio de Schneider (*Schneider's Drosophyla Medium*; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) contendo 50 µg.mL⁻¹ de gentamicina (pH 7,2) e suplementado com 10% ou 20% de soro fetal bovino inativado (SFB; Gibco, Grand Island, NY, EUA) para *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, respectivamente.

As formas amastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foram obtidas por cultivo axênico segundo protocolo descrito por Teixeira e colaboradores (2002). Brevemente, os promastigotas de culturas em fase estacionária foram submetidos a três ciclos de lavagem em salina a 0,15 M tamponada com fosfato, pH 7,2 (PBS) por

centrifugação (1620 x g por 10 minutos, a 4° C). Após as lavagens, os parasitos foram transferidos para meio de Schneider contendo 50 µg.mL⁻¹ de gentamicina (pH 5,4) e suplementado com 5% ou 20% SFB, para *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, respectivamente. As formas promastigotas foram cultivadas sob condições estéreis em temperatura constante de 33° C, durante 7 dias. Após a transformação, os amastigotas axênicos foram lavados em PBS, centrifugados (1620 x g por 10 minutos, a 4° C) e estocados a -70° C até o momento do uso.

5.3 Extratos de *Leishmania*

Os amastigotas foram ressuspensos em PBS estéril (10⁷ células.mL⁻¹) e lisadas mecanicamente por ultrassom (10 ciclos de 1 minuto, amplitude 40, com intervalos de 1 minuto entre cada ciclo, a 4° C; *Branson's Cell Disruptor*, Branson Sonic Power Company, Danbury, CT, EUA). Os extratos foram centrifugados (10.000 x g, 10 minutos, a 4° C) e os sobrenadantes, após filtração através de membrana com poros de 0,45 µm (Millipore, São Paulo, SP, Brasil), constituíram o que se denomina neste trabalho de *ELa* e *ELb*. Por fim, todo o material produzido foi estocado a -70° C até o momento do uso.

5.4 Fracionamento do *ELa*

O *ELa* foi dialisado por 16 horas contra Tris-HCl a 20 mM, pH 8,0, a 4° C, centrifugado (14.000 x g, 10 minutos, 4° C) e filtrado (poros de 0,45 µm). O sobrenadante obtido foi aplicado (7-16 mg de proteínas de cada vez) em uma coluna de troca iônica (MonoQ[®] 5/50 GL; GE Healthcare, Uppsala, Suécia) acoplada a um

sistema automático de cromatografia de alta resolução (ÄKTApurifier; GE Healthcare, Uppsala, Suécia), previamente equilibrada com Tris-HCl a 20 mM, pH 8,0. O efluente da coluna foi coletado e após lavagem da mesma com 20 mL de Tris-HCl a 20 mM, pH 8,0, as proteínas aderidas à coluna foram eluídas com o uso de um gradiente linear crescente de salinidade (Tris-HCl a 20 mM pH 8, contendo 0 a 0,5 M de NaCl, em um volume de 20 mL). As proteínas que ainda encontravam-se aderidas à coluna foram finalmente eluídas com o aumento abrupto da salinidade (Tris-HCl a 20 mM, pH 8, contendo 1 M de NaCl, volume de 5 mL). Foram coletadas frações de 1 mL (contendo cada uma delas moléculas com graus similares de eletronegatividade) e a absorvância ($Abs_{280\text{ nm}}$) dos efluentes foi monitorada para a detecção dos picos de proteínas.

5.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida e detecção de atividade proteolítica

As frações do ELA, obtidas por cromatografia líquida em coluna de troca iônica, foram caracterizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% na presença de dodecil sulfato de sódio, como descrito por Laemmli (1970). Após a eletroforese de 20 μg de proteína/poço das amostras, a 100 V/20 mA em cuba para eletroforese vertical Hoefer SE300 *minVE* (Hoefer Inc., Holliston, MA, EUA), os géis foram corados durante 30 minutos, a temperatura ambiente, em solução de metanol/ácido acético/água destilada (4,5:1:4,5), contendo 2,5% de azul de Coomassie (Sigma, St. Louis, MO, EUA), e descorados em solução de metanol/ácido acético/água destilada (0,5:0,75:8,75). Foram utilizados como padrões de massa molecular: β -galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), albumina

sérica (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (21 kDa) e lisozima (14,4 kDa), todos da Bio-rad (*MW, Broad range*; Bio-rad, Hercules, CA, EUA).

As atividades proteolíticas dos extratos totais (*ELa* e *ELb*) e das frações do *ELa* foram determinadas em ensaio de eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) copolimerizado com gelatina a 0,1% (*Gelatin type A*; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), como descrito por Silva-Lopez e Giovanni-De-Simone (2004). Após a eletroforese, os géis foram lavados com 2,5% de Triton X-100 durante 1 hora a temperatura ambiente para a remoção do SDS. Após a lavagem, os géis foram incubados por 16 horas, a temperatura ambiente, em tampão de proteólise (Tris-HCl a 100 mM, pH 8,0). Em seguida, os géis foram corados com 0,1% de Amido Black (*Naphthol Blue Black*; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e descorados em solução metanol/ácido acético/água destilada (3:1:6). As regiões com atividade enzimática foram caracterizadas por uma zona clara (halo de degradação) sobre uma matriz (escura) de gelatina.

5.6. Agrupamento das frações do *ELa*

Após as análises em gel, as frações do *ELa*, obtidas após cinco procedimentos independentes de cromatografia em coluna de troca iônica, foram reunidas em quatro grupos [fração 1 (eluída com 0,03 a 0,05 M de NaCl), fração 2 (eluída com 0,09 a 0,12 M de NaCl), fração 3 (eluída com 0,15 a 0,22 M de NaCl) e fração 4 (eluída com 0,28 a 0,35 M de NaCl)], de acordo com similaridades de perfis eletroforéticos e atividades proteolíticas compartilhadas.

5.7 Quantificação de proteínas

Os conteúdos proteicos nos extratos e nas frações do *ELa* foram determinados pelo método de Lowry (LOWRY *et al.* 1951), usando uma curva de albumina sérica bovina como padrão (concentração inicial de 6,4 mg.mL⁻¹ e final de 0,1 mg.mL⁻¹). As amostras foram diluídas a 1:2 e 1:4 em PBS, utilizado como branco do teste. Um mL da mistura de reagentes A+B+C (A: 50 mL de carbonato de sódio a 0,125 M com 0,2 g de hidróxido de sódio; B: 0,5 mL de tartarato de sódio e potássio a 2% em água; C: 0,5 mL de sulfato de cobre a 1% em água) foi adicionado à curva padrão, amostras e branco. Após 10 minutos, foram adicionados 100 µL do reagente fenol (Folin & Ciocalteu's, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) diluído em água, na proporção 1:1. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente (protegidas da luz) durante 30 minutos. A Abs_{750 nm} das amostras foi determinada em espectrofotômetro.

5.8 Tratamento de camundongos com *ELa* e frações

Cada animal dos grupos de seis camundongos BALB/c recebeu três injeções intradérmicas (0,2 mL) contendo: 20 µg de *ELa*, 9 µg da fração 1, 6 µg da fração 2, 10 µg da fração 3 ou 5 µg da fração 4. As quantidades de proteínas (das diferentes frações) administradas foram calculadas de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Quantidade de proteínas} = \frac{\text{Quantidade grupo ELa}}{\left(\frac{\text{Total de proteínas fracionadas (cromatografia)}}{\text{Total de proteínas recuperadas em cada fração}} \times k \right)}$$

Onde k (constante de correção) é igual a 2. As injeções foram administradas com intervalos de 15 dias. Simultaneamente, os animais do grupo controle receberam injeções contendo PBS (veículo).

5.9 Modelo murino de leishmaniose cutânea

10^7 promastigotas de *L. braziliensis*, obtidas de cultura em fase estacionária, foram inoculados subcutaneamente no coxim de uma das patas traseiras de camundongos BALB/c, uma semana após a primeira injeção do ELa ou das frações. O desenvolvimento das lesões cutâneas foi monitorado semanalmente com o emprego de um paquímetro digital de precisão (Mitutoyo, Suzano, SP, Brasil) e o tamanho das lesões foi estimado pela diferença entre os tamanhos das patas infectada e não infectada.

5.10 Quantificação de carga parasitária

As cargas parasitárias no sítio de infecção foram estimadas através de ensaio de diluição limitante descrito por Lima e colaboradores (1997). As patas infectadas foram maceradas (*Tissue Grinder* de 2 mL, Wheaton Science Products, Millville, NJ,

EUA) em meio de Schneider e centrifugadas a 50 x g, por 10 minutos, a 4° C. Os sobrenadantes foram novamente centrifugados (1540 x g, 10 minutos, 4° C) e os sedimentos foram diluídos em meio de Schneider, suplementado com 50 µg.mL⁻¹ de gentamicina e 20% de SFB. As suspensões foram diluídas seriadamente (fator de diluição = 10; de 10⁰ a 10¹¹) e distribuídas em placas de cultura de 96 poços, em triplicatas. O número de parasitos em cada lesão foi determinado considerando-se o valor da maior diluição em que pelo menos um promastigota viável pode ser detectado após 7 dias de cultivo (24° C).

5.11 Obtenção e cultivo de macrófagos peritoneais residentes

Macrófagos residentes foram obtidos após lavagens da cavidade peritoneal de BALB/c [2 lavagens com 10 mL de solução salina (NaCl a 0,9%) gelada + 20 UI.mL⁻¹ de heparina]. O lavado peritoneal foi centrifugado a 300 x g, durante 10 minutos, a 4° C e as células foram diluídas em meio DMEM completo (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; GIBCO, Grand Island, NY, EUA), suplementado com 10% de SFB, gentamicina a 50 µg.mL⁻¹, bicarbonato de sódio a 3,6 g.L⁻¹, HEPES a 25 mM e glutamina a 2 mM. As células peritoneais foram marcadas com anticorpos fluorescentes anti-F4/80-PE e anti-CD11b-FITC (eBioscience, Inc., San Diego, CA, EUA) e analisadas por citometria de fluxo para confirmação de seus fenótipos. Os macrófagos foram distribuídos em placas de 24 poços (10⁶/poço) e após 18 horas, a 37° C, 5% CO₂, as culturas foram lavadas com solução salina para a remoção das células não aderentes. Os macrófagos foram estimulados durante 6, 18, 30 ou 42 horas (37° C, 5% CO₂) com diferentes concentrações do ELa (1 µg.mL⁻¹, 10 µg.mL⁻¹, 100 µg.mL⁻¹ ou 500 µg.mL⁻¹) na ausência ou na presença de LPS (1000 ng.mL⁻¹;

Escherichia coli 0127:B8; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Paralelamente, macrófagos foram ativados com LPS (1000 ng.mL⁻¹) e simultaneamente estimulados (por 42 horas) com as frações 1, 2, 3 ou 4 do ELA (a 100 µg.mL⁻¹). Imediatamente após o cultivo, os sobrenadantes foram coletados e utilizados em ensaios para detecção de citocinas e nitrito.

5.12 Dosagem de citocinas

As concentrações de TNF- α , IL-12p70, IL-6 e IL-10 nos sobrenadantes de culturas de macrófagos foram determinadas através de ELISA, de acordo com instruções do fabricante (Kit ELISA Ready-SET-Go![®]; eBioscience, Inc., San Diego, CA, EUA). Para a detecção de TNF- α e IL-6, as amostras foram diluídas (1:10) em PBS suplementado com 5% de albumina sérica bovina. Para a dosagem de IL-12p70 e IL-10 foram utilizados sobrenadantes sem diluição prévia (100 µL). Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (Costar 9018, *high protein-binding*; Corning, Lowell, MA, EUA). A Abs_{450 nm} das amostras foi determinada em espectrofotômetro.

5.13 Detecção da produção de nitrito

A produção de óxido nítrico (NO) foi determinada indiretamente pela quantificação de nitrito no sobrenadante de cultura de macrófagos através da reação de Griess (MIGLIORINI *et al.* 1991). Brevemente, 50 µL da amostra foram misturados em volume igual do reagente de Griess [1:1 (v/v) de 1% sulfanilamida (em 5% H₃PO₄) e 0,1% N-1-1-naftiletlenodiamina (todos os reagentes da Sigma-

Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)]. Após 15 minutos, as $Abs_{540\text{ nm}}$ das amostras foram determinadas. As concentrações de NO_2^- nos sobrenadantes foram determinadas com o auxílio de uma curva padrão de NaNO_2 (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

5.14 Análises estatísticas

A distribuição dos dados, devido ao número relativamente pequeno de amostras por grupo ($n=6$), foi considerada como não gaussiana. As comparações entre dois grupos experimentais foram feitas pelo teste U de Mann-Whitney. As análises de mais de dois grupos experimentais foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido por pós-teste de Dunn. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Análise zimográfica dos extratos de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

Enquanto o gel em que foi realizado a eletroforese do *ELa* apresentou quatro regiões com atividade proteolítica (massas moleculares aparentes de 115 kDa, 68 kDa, 63 kDa e 28 kDa), o gel em que foi realizado a eletroforese do *ELb* apresentou apenas uma região com atividade enzimática (63 kDa) (**Figura 1**).

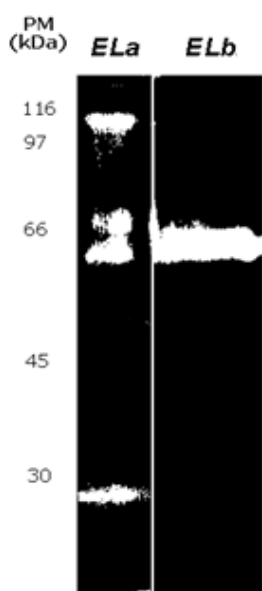


Figura 1: Análise zimográfica dos extratos de amastigotas de *Leishmania amazonensis* (*ELa*) e *Leishmania braziliensis* (*ELb*). As formas amastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foram obtidas por cultivo axênico, como detalhado na seção Materiais e Métodos. Após a lise dos parasitos, as atividades proteolíticas dos extratos totais foram determinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% copolimerizado com gelatina a 0,1% (substrato). Os géis foram corados em solução de Amido Black a 0,1%. As regiões com atividade proteolítica são caracterizadas por uma zona clara (halo de degradação) sobre uma matriz (escura) de gelatina; PM = padrões de massa molecular, expressos em kDa.

6.2 Fracionamento do ELa

Como sumarizado na **Tabela 1**, foi fracionado um total de 62 mg de proteínas por cromatografia líquida em coluna de troca iônica, em cinco procedimentos independentes. A quantidade total de material recuperado após a eluição da coluna (percentual de recuperação) foi de aproximadamente 48% (cerca de 30 mg).

Tabela 1: Cromatografia líquida em coluna de troca iônica do extrato de amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

	Quantidade de Proteína ^b	% recuperação ^c
MonoQ (TI) 1 ^a	7 mg	
MonoQ (TI) 2	16 mg	
MonoQ (TI) 3	15 mg	
MonoQ (TI) 4	12 mg	
MonoQ (TI) 5	12 mg	
TOTAL	62 mg	48% (30 mg)

^aCromatografia líquida em coluna de troca iônica [MonoQ (TI)]. Total de cinco procedimentos; ^bQuantidade de proteína aplicada na coluna em cada procedimento; ^cQuantidade total de proteína recuperada após a eluição da coluna;

Na **Figura 2** é representado o perfil (cromatograma) de eluição das frações de 1 mL do ELa. O procedimento apresentou alta resolução no fracionamento do extrato, determinada pelo grau de separação entre os picos de proteínas detectados. A maioria das proteínas foi eluída da coluna na faixa de salinidade entre 0,15 a 0,38 M, e por consequência encontram-se nas frações A6 a A18.

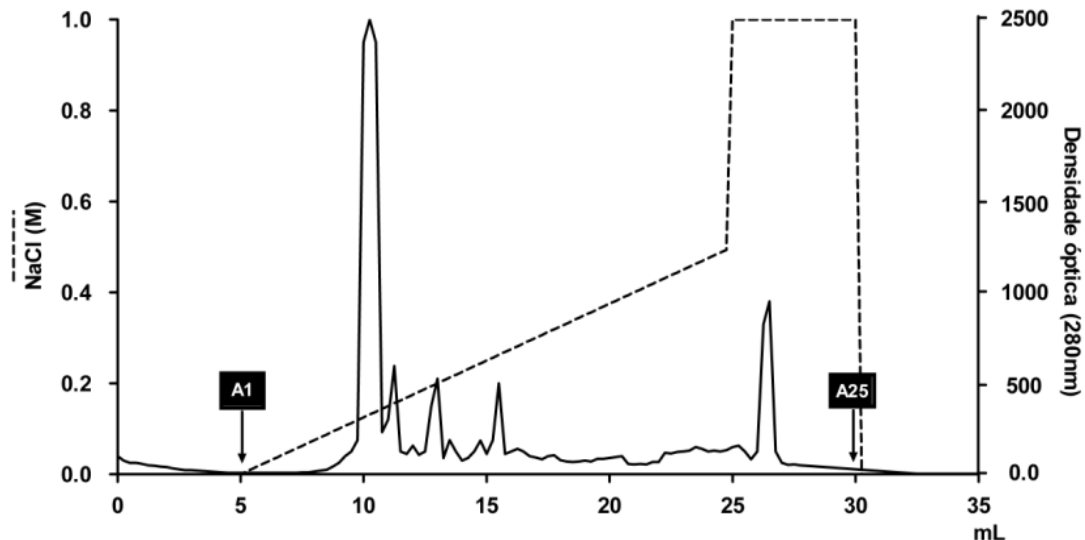


Figura 2: Perfil (cromatograma) da purificação do extrato de amastigotas de *Leishmania amazonensis* (ELa) através de cromatografia líquida em coluna de troca iônica. O ELa foi aplicado (7 a 16 mg de proteínas) em coluna de troca iônica, previamente equilibrada com 20 mM Tris-HCl (pH 8,0). As frações de 1 mL (A1 a A25) foram eluídas de acordo com o aumento da salinidade (Tris-HCl a 20 mM, contendo 0 a 1M de NaCl, pH 8,0). A densidade óptica a 280 nm dos eluentes foi monitorada para a detecção dos picos de proteínas. Cromatograma representativo de cinco procedimentos independentes.

6.3 Caracterização das frações do ELa através de eletroforese em gel de poliacrilamida e detecção de atividades proteolíticas

As frações A6 a A18 foram as que apresentaram bandas mais intensas no gel de poliacrilamida após eletroforese (**Figura 3 – Azul de Coomassie**). Os cinco procedimentos independentes de purificação apresentaram resultados muito semelhantes entre si, determinado pela quantidade e qualidade de proteínas nas frações obtidas (dados não mostrados).

Aparentemente, todas as proteases detectadas no extrato total de *L. amazonensis* foram recuperadas durante a cromatografia (**Figura 3 – Zimograma**). Proteases com massas moleculares aparentes de cerca de 115 kDa, 68 kDa e 63

kDa foram detectadas nas frações A9, A10, e A12 a A21. Uma banda com atividade enzimática e massa molecular aparente de 28 kDa foi detectada com maior intensidade nas frações A14 a A17. Surpreendentemente, após o fracionamento do *ELa*, uma proteína com atividade proteolítica e com massa molecular aparente de cerca de 37 kDa, não observada no extrato total, foi detectada nas frações A17 e A18.

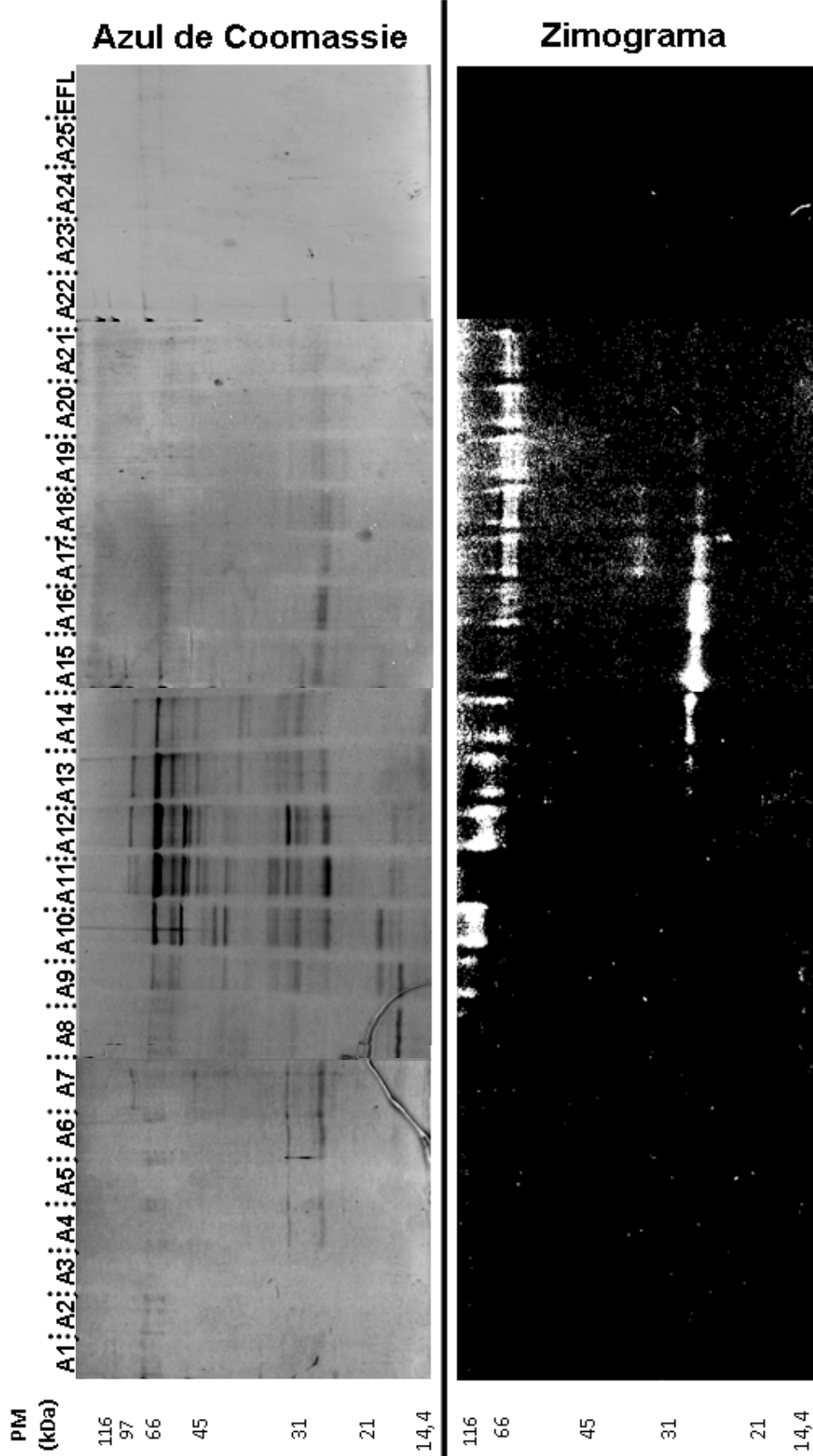


Figura 3: Caracterização das frações do extrato de amastigotas de *Leishmania amazonensis* (ELa) através de eletroforese em gel de poliacrilamida e detecção de atividade proteolítica. O ELa foi fracionado através de cromatografia líquida em coluna de troca iônica, como detalhado em Materiais e Métodos. Após a purificação, as frações obtidas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% na presença de dodecil sulfato de sódio e os géis foram corados (Azul de Coomassie). Paralelamente, os perfis zimográficos das frações do ELa foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% copolimerizado com 0,1% de gelatina (Zimograma). Os géis foram corados em solução de 0,1% de Amido Black. As regiões com atividade proteolítica são caracterizadas por uma zona clara (halo de degradação) sobre uma matriz (escura) de gelatina. PM = padrões de massa molecular, expressos em kDa. EFL = material não aderido à coluna. As fotografias são de géis representativos de cinco procedimentos independentes.

6.4 Caracterização das frações do ELa agrupadas de acordo com similaridades de perfis eletroforéticos na presença de dodecil sulfato de sódio e com o compartilhamento de atividades proteolíticas (frações 1, 2, 3 e 4)

As análises por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, e pela mesma eletroforese em gel copolimerizado com gelatina mostraram que as frações agrupadas 1, 2, 3 e 4 diferem entre si em relação à qualidade e à quantidade de proteínas/proteases presentes. Todas as proteases detectadas no extrato total de amastigotas de *L. amazonensis* encontram-se nas frações 3 e/ou 4. Não foram detectadas atividades proteolíticas nas frações 1 e 2.

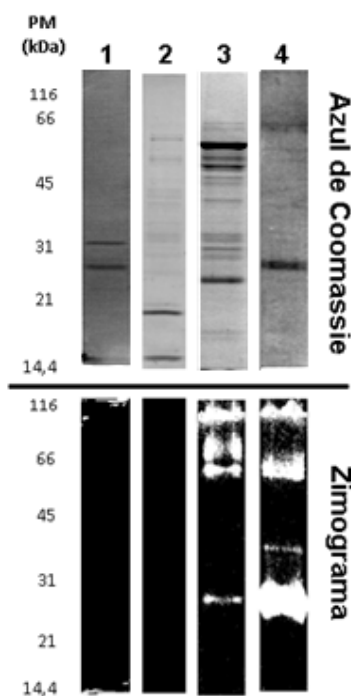


Figura 4: Caracterização das frações agrupadas do extrato de amastigotas de *Leishmania amazonensis* (ELa) através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio seguida de coloração para proteína (**Azul de Coomassie**) e detecção de atividade proteolítica (**Zimograma**). Após a purificação do ELa em coluna de troca iônica, as frações adjacentes e similares (quanto ao perfil eletroforético na presença de dodecil sulfato de sódio e à presença de atividade enzimática) foram reunidas em quatro grupos: fração 1 (**1**), fração 2 (**2**), fração 3 (**3**) e fração 4 (**4**). As regiões com atividade proteolítica são caracterizadas por uma zona clara (halo de degradação) sobre uma matriz (escura) de gelatina. PM = padrões de massa molecular, expressos em kDa.

6.5 Avaliação das atividades das frações do ELa em modelo murino de leishmaniose tegumentar

Como esperado, a administração quinzenal do ELa em camundongos BALB/c aumentou significativamente o tamanho das lesões causadas por *L. braziliensis*, em relação aos animais injetados com PBS ($p < 0,01$, a partir da 3^a semana de infecção; **Figura 5A**). Após cinco semanas de infecção, os animais tratados com as frações 2, 3 ou 4 do ELa também apresentaram aumentos significativos das lesões, em relação aos animais injetados com PBS (frações 2 e 3, $p < 0,01$; fração 4, $p < 0,01$; **Figura 5A**). Diferentemente do tratamento com as outras frações purificadas do ELa, o tratamento com a fração 1 não alterou significativamente o desenvolvimento da lesão causada por *L. braziliensis*.

Os animais que receberam o ELa apresentaram cerca de 1000 vezes mais parasitos, no sítio da infecção, em relação ao número de parasitos encontrados nas patas dos animais injetados com PBS ($p < 0,001$; **Figura 5B**). Apesar de todas as frações aparentemente interferirem no curso da infecção, aumentando o número de parasitos no sítio da infecção, apenas os tratamentos com as frações 2, 3 ou 4 foram capazes de aumentar significativamente a carga parasitária na pata dos animais em relação ao grupo de animais injetados com PBS (fração 2, $p < 0,01$; frações 3 e 4, $p < 0,05$; **Figura 5B**).

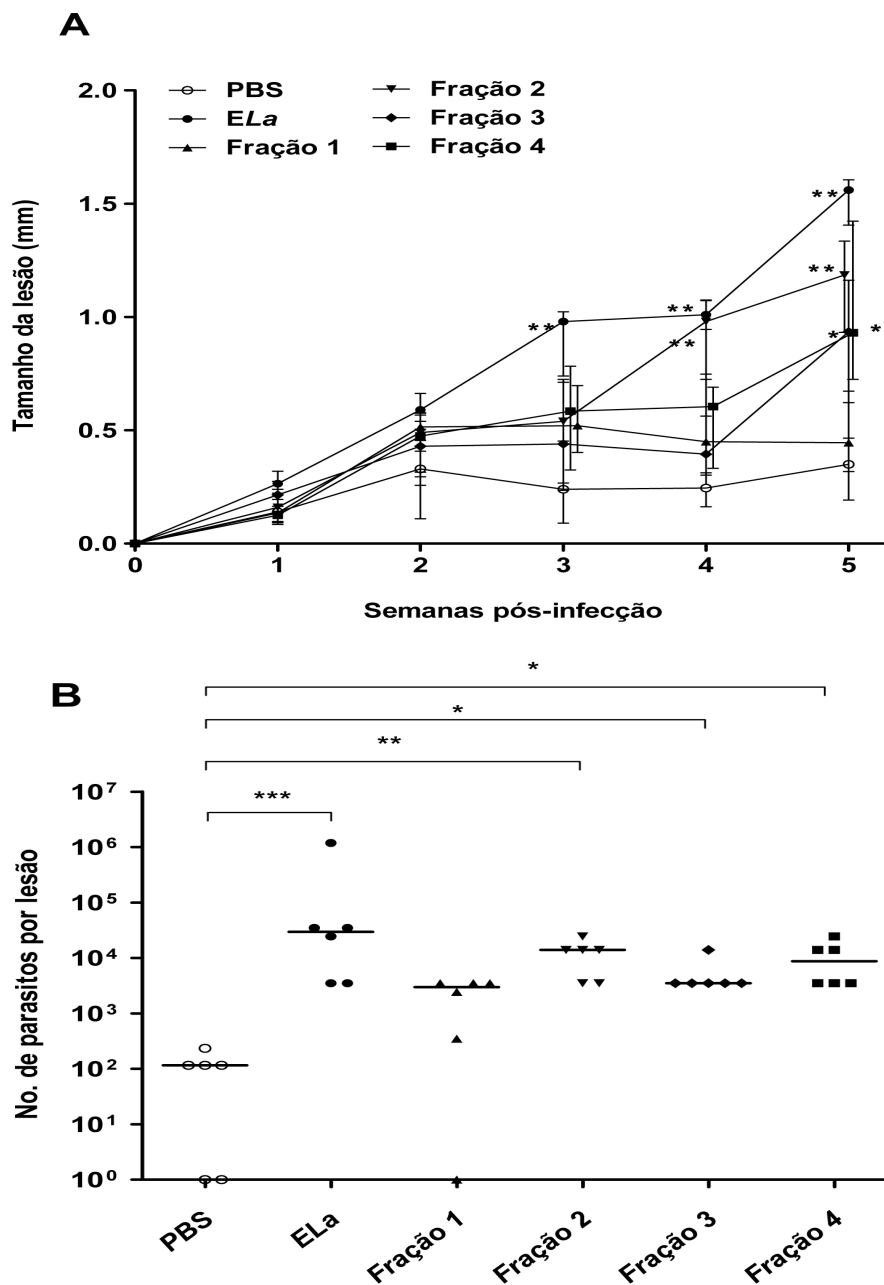


Figura 5: Efeito das frações purificadas do extrato de amastigotas de *Leishmania amazonensis* (ELa) em modelo murino de leishmaniose tegumentar. Cada animal (grupos de 6 BALB/c) recebeu três injeções quinzenais contendo o ELa ou as frações purificadas do extrato total. Simultaneamente, os animais do grupo controle receberam injeções contendo PBS. Uma semana após o início dos tratamentos, 10^7 promastigotas de *L. braziliensis*, obtidas de cultura em fase estacionária, foram inoculadas em uma das patas traseiras dos animais. **A**, monitoramento do desenvolvimento do tamanho das lesões cutâneas nos animais tratados com PBS, 20 μ g de ELa, 9 μ g da fração 1, 6 μ g da fração 2, 10 μ g da fração 3 ou 5 μ g da fração 4. Cada ponto representa a mediana do grupo de animais e as barras verticais representam o intervalo entre o 10^o e o 90^o percentís. **B**, carga parasitária (cinco semanas após a infecção) nas patas dos animais tratados com PBS, ELa, fração 1, fração 2, fração 3 ou fração 4, determinada por diluição limitante. Cada ponto representa o resultado obtido de um animal individualmente; as linhas horizontais representam as medianas de cada grupo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

6.6 Efeitos do ELa sobre macrófagos peritoneais de BALB/c

6.6.1 Modulação da produção basal de citocinas e nitrito pelo ELa

Quando macrófagos peritoneais de BALB/c foram tratados durante 42 horas com o ELa ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), apenas a produção de TNF- α (**Figura 6A**) foi suprimida ($p < 0,01$). As produções basais das demais citocinas analisadas (IL-12p70, IL-6 e IL-10) (**Figura 6B, 6C e 6D**) e de NO (**Figura 7**) não foram afetadas pelo tratamento.

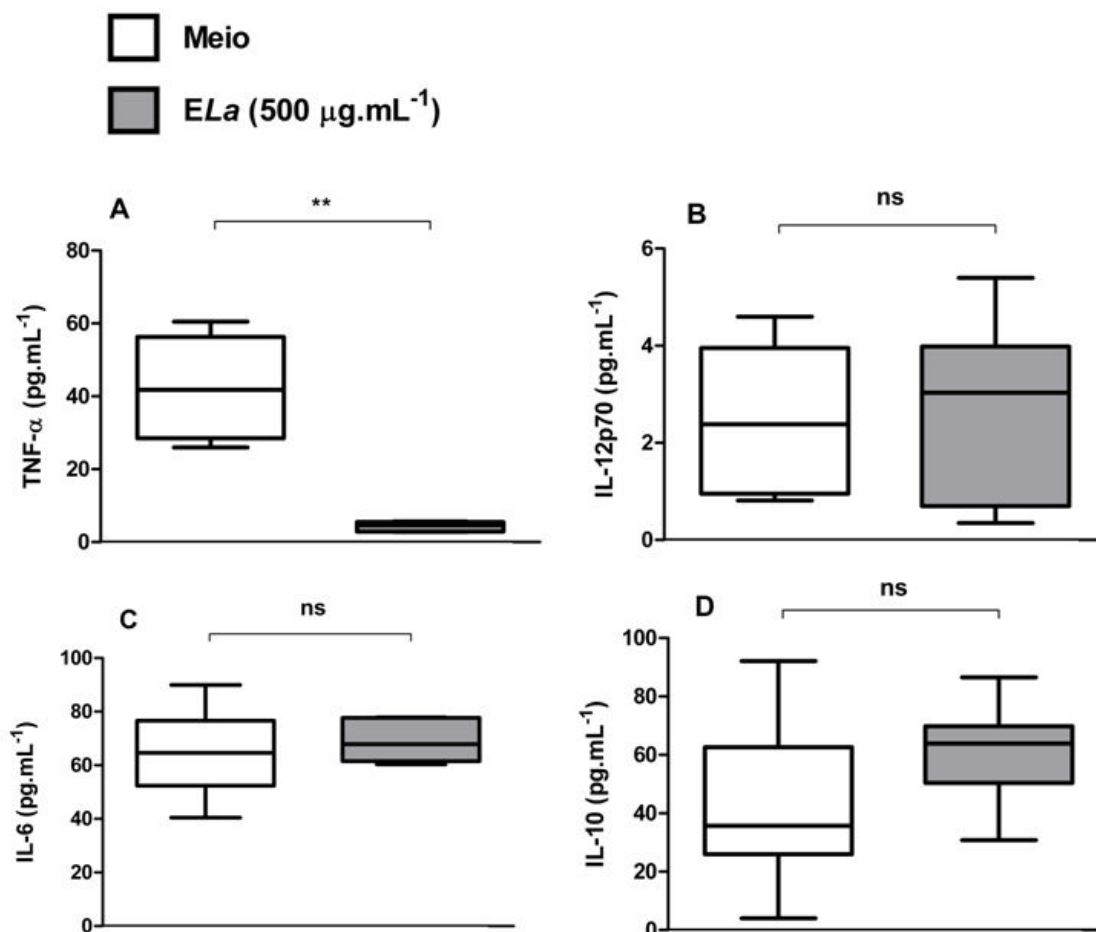


Figura 6: Produção de citocinas em macrófagos tratados com o extrato de amastigotas de *Leishmania amazonensis* (ELa). 10^6 macrófagos peritoneais residentes de camundongos BALB/c normais foram cultivados durante 42 horas na ausência (Meio) ou na presença de ELa ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$). As concentrações de TNF- α (A), IL-12p70 (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) nos sobrenadantes das culturas de macrófagos foram determinadas por ELISA, como descrito no Materiais e Métodos. Os dados são representativos de três experimentos independentes. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo; os boxes representam os percentís 25° - 75°; as linhas verticais representam os percentís 10° - 90°. **, $p < 0,01$; ns, não significativo.

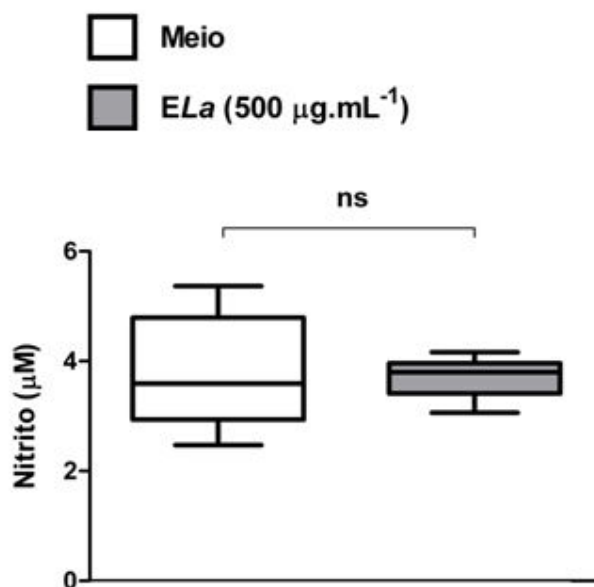


Figura 7: Produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos tratados com o extrato de amastigotas *Leishmania amazonensis* (ELA). 10^6 macrófagos peritoneais residentes de camundongos BALB/c normais foram cultivados durante 42 horas na ausência (Meio) ou na presença de ELA ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A produção de NO foi determinada indiretamente pela quantificação de nitrito nos sobrenadantes de culturas de macrófagos através da reação de Griess, detalhado em Materiais e Métodos. Os dados são representativos de três experimentos independentes. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo; os boxes representam os percentís 25° - 75°; as linhas verticais representam os percentís 10° - 90°. ns, não significativo.

6.6.2 Modulação da produção de citocinas e nitrito pelo ELA em macrófagos ativados por LPS

Em células estimuladas por LPS e simultaneamente tratadas com concentrações crescentes do ELA, de modo geral, após 42 horas, os tratamentos com altas concentrações do ELA ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ou $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram capazes de inibir significativamente a produção das citocinas inflamatórias avaliadas (TNF- α , IL-12p70 e IL-6) (Figura 8A, 8B e 8C) e de NO (Figura 9). De maneira oposta, os tratamentos

com as maiores concentrações do *ELa* aumentaram a produção de IL-10, após ativação por LPS (**Figura 8D**).

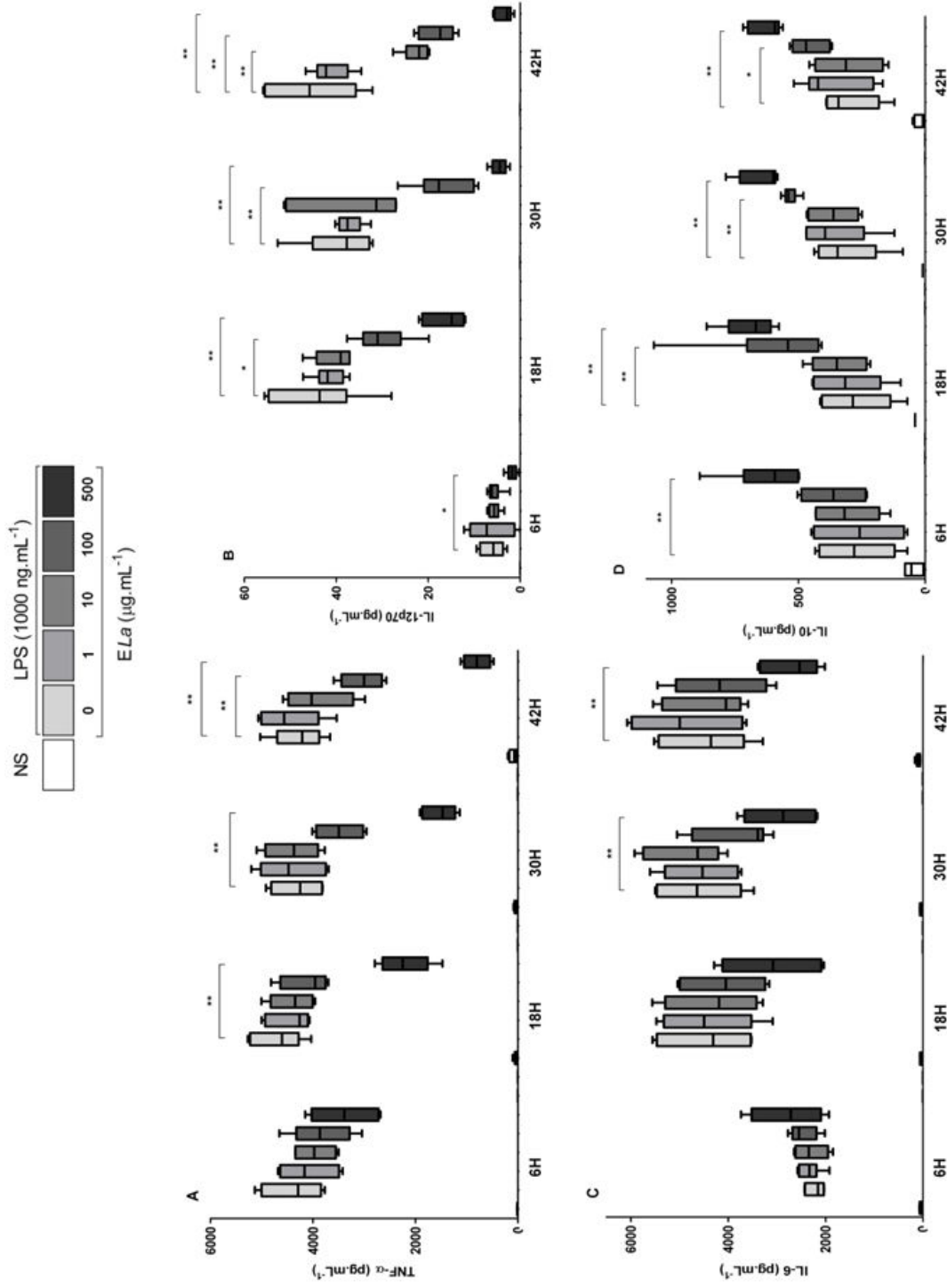


Figura 8: Modulação da produção de citocinas pelo extrato de amastigotas de *Leishmania amazonensis* (ELa) em macrófagos ativado por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). 10^6 macrófagos peritoneais residentes de camundongos BALB/c normais foram ativado por LPS (1000 ng.mL^{-1}) e simultaneamente tratados com concentrações crescentes do ELa ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), durante 6, 18, 30 ou 42 horas. As concentrações de TNF- α (A), IL-12p70 (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) nos sobrenadantes das culturas de macrófagos foram determinadas por ELISA, como descrito em Materiais e Métodos. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo; os boxes representam os percentis 25° - 75°; as linhas verticais representam os percentis 10° - 90°. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

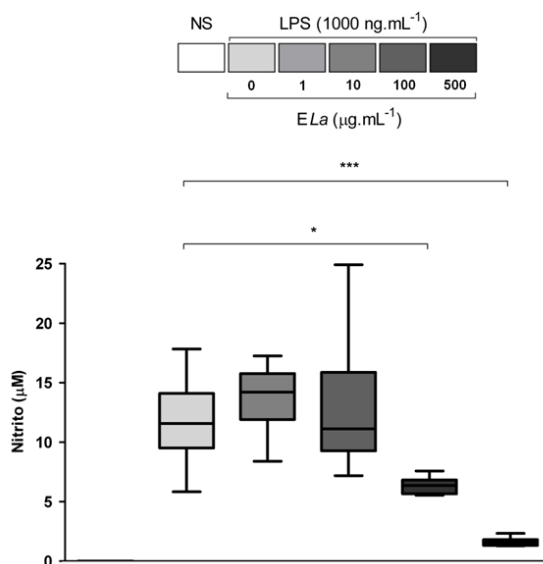


Figura 9: Modulação da produção de óxido nítrico (NO) pelo extrato de amastigotas de *Leishmania amazonensis* (ELa) em macrófagos ativados por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). 10^6 macrófagos peritoneais residentes de camundongos BALB/c normais foram ativados por LPS (1000 ng.mL^{-1}) e simultaneamente tratados com concentrações crescentes do ELa ($1 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou $500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), durante 42 horas. A produção de NO foi determinada indiretamente pela quantificação de nitrito nos sobrenadantes de culturas de macrófagos através da reação de Griess, detalhado em Materiais e Métodos. Os dados são representativos de experimentos independentes. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo; os boxes representam os percentis 25° - 75°; as linhas verticais representam os percentis 10° - 90°. *, $p < 0,05$ ***, $p < 0,001$.

6.7 Atividades das frações purificadas do ELa em macrófagos ativados por LPS

Quando as frações purificadas do ELa foram testadas *in vitro* para a identificação das moléculas de *L. amazonensis* responsáveis pela supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias e do NO e pelo aumento da produção de IL-10 em macrófagos ativados por LPS, a fração 3 foi capaz de suprimir significativamente ($p < 0,05$) a produção de TNF- α (**Figura 10A**). As demais frações (frações 1, 2 e 4) não alteraram o padrão de produção de citocinas em macrófagos ativados por LPS (**Figura 10A a 10D**). Surpreendentemente, a fração 4 aumentou significativamente a produção de NO ($p < 0,001$). As demais frações não foram

capazes de modular a produção de NO em macrófagos ativados (**Figura 11**). A fração efluente da coluna (isto é, que não se prendeu a mesma) não teve efeito sobre a produção de citocinas e NO (dados não mostrados).

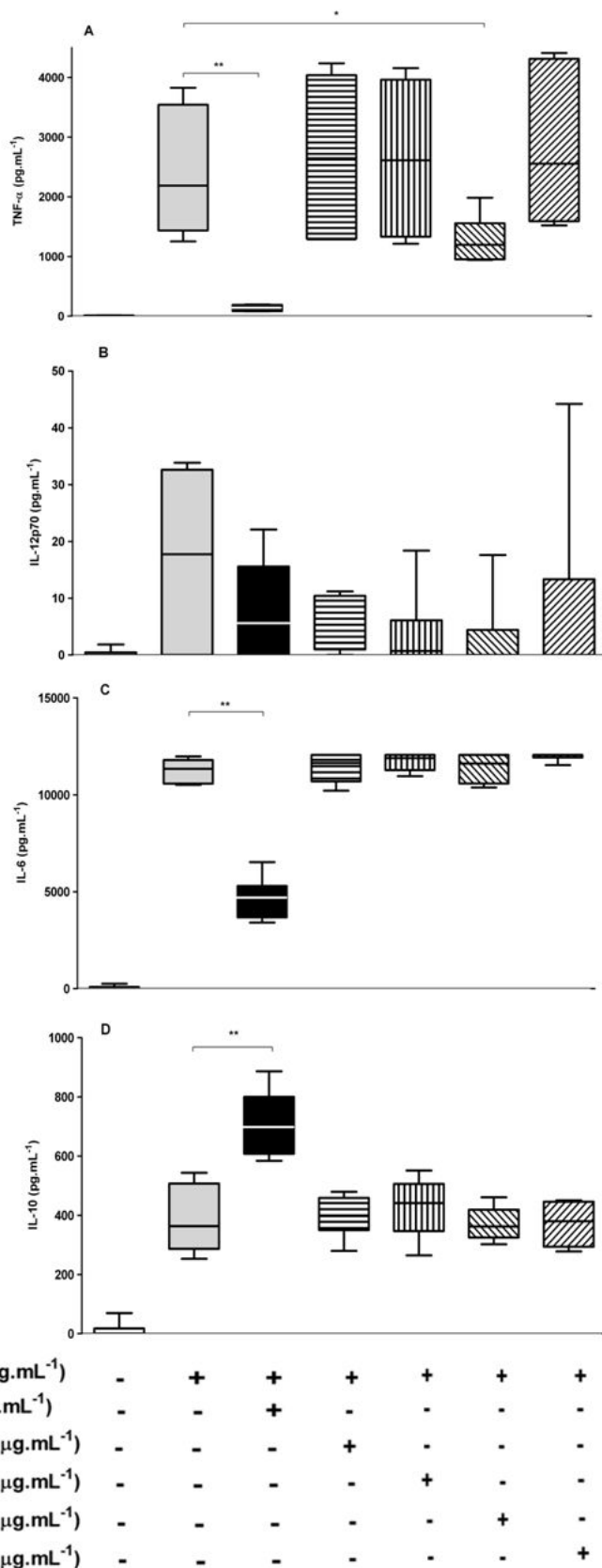


Figura 10: Modulação da produção de citocinas pelas frações purificadas do extrato de amastigotas de *Leishmania amazonensis* (ELa) em macrófagos ativados por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). 10^6 macrófagos peritoneais residentes de camundongos BALB/c normais foram ativados por LPS (1000 ng.mL^{-1}) e simultaneamente tratados com 500 μg.mL^{-1} do ELa ou com 100 μg.mL^{-1} das frações 1, 2, 3 ou 4, durante 42 horas. As concentrações de TNF- α (A), IL-12p70 (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) nos sobrenadantes das culturas de macrófagos foram determinadas por ELISA, como descrito em Materiais e Métodos. Os dados são representativos de dois experimentos independentes; As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo; os boxes representam os percentís 25° - 75°; as linhas verticais representam os percentís 10° - 90°. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

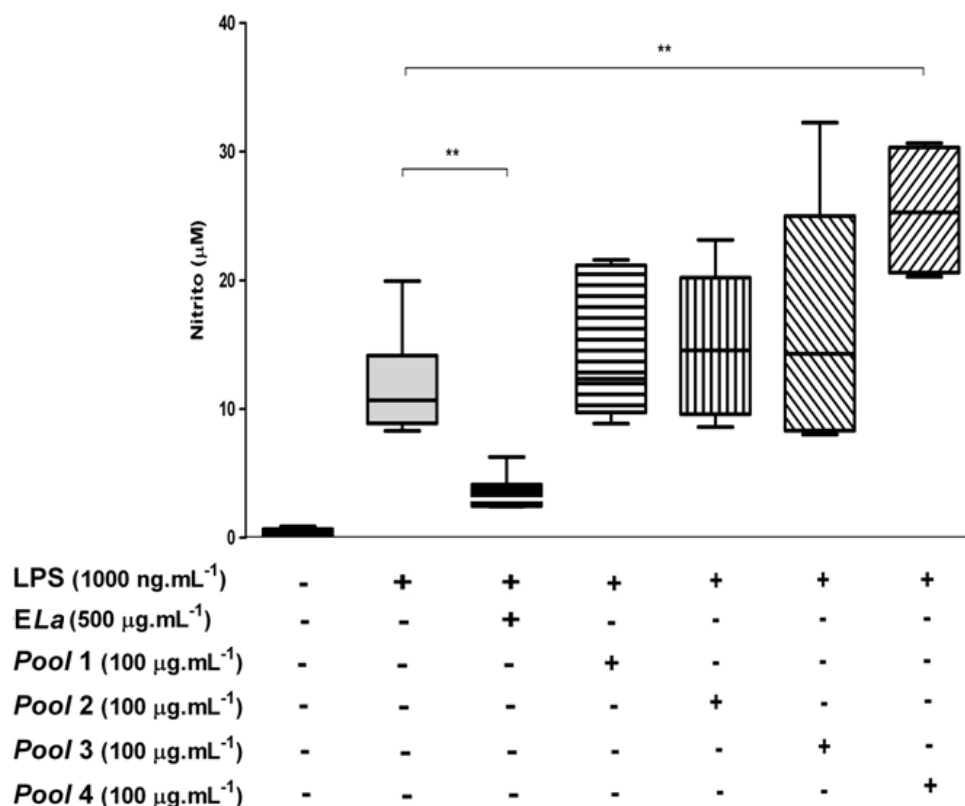


Figura 11: Modulação da produção de óxido nítrico (NO) pelas frações purificadas do extrato de amastigotas de *Leishmania amazonensis* (ELa) em macrófagos ativado por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). 10^6 macrófagos peritoneais residentes de camundongos BALB/c normais foram ativados por LPS (1000 ng.mL^{-1}) e simultaneamente tratados com 500 µg.mL^{-1} do ELa ou com 100 µg.mL^{-1} das frações 1, 2, 3 ou 4, durante 42 horas. A produção de NO foi determinada indiretamente pela quantificação de nitrito nos sobrenadantes das culturas de macrófagos através da reação de Griess, detalhado em Materiais e Métodos. Dados representativos de 2 experimentos independentes. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo; os boxes representam os percentis 25° - 75°; as linhas verticais representam os percentis 10° - 90°. **, $p < 0,01$.

7. DISCUSSÃO

Em trabalho prévio, realizado por Silva e colaboradores (submetido para publicação), foi observado que o tratamento com *ELa*, e não com *ELb*, é capaz de aumentar a suscetibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *L. braziliensis*. Interessantemente, a adição de inibidores de proteases ao *ELa* diminuiu a sua capacidade de agravar a infecção. Esses dados estão de acordo com a observação recente de que a imunização de camundongos BALB/c com serino-proteases purificadas do extrato de *L. amazonensis* promove o aumento da suscetibilidade à infecção homóloga (DE MATOS-GUEDES *et al.*, 2010). Além das serino-proteases, foi mostrado que cepas mutantes de *L. mexicana*, que não expressam a CPB, têm a virulência reduzida em relação aos parasitos que produzem essa cisteíno-protease normalmente (ALEXANDER *et al.*, 1998).

Para avaliar a expressão diferencial de proteases em amastigotas de *L. amazonensis* e de *L. braziliensis*, as proteínas dos extratos totais dos parasitos foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de uma matriz de colágeno (gelatina), o que possibilitou a detecção de bandas com atividade proteolítica. Foram detectadas no *ELa* quatro proteases com atividade gelatinolítica, com massas moleculares aproximadas de 115 kDa, 68 kDa, 63 kDa e 28 kDa (**Figura 1**).

Apesar da necessidade da realização de experimentos adicionais, é provável que as enzimas detectadas no *ELa* já tenham sido identificadas em estudos prévios, porém as funções da maioria delas continuam desconhecidas. Silva-Lopez e colaboradores (2004) e Choudhury e colaboradores (2009) isolaram um fator excretório de *L. amazonensis* e *L. donovani*, com massa molecular de 115 kDa,

sensível à ação de inibidores de serino-proteases. Morgado-Díaz e colaboradores (1998) identificaram uma serino-protease de *L. amazonensis* com massa molecular aparente de 68 kDa. No entanto, até o momento, nenhum estudo foi conduzido para determinar os papéis dessas proteases na relação parasito-hospedeiro. A protease com 28 kDa, detectada exclusivamente no extrato de *L. amazonensis*, tem a mesma massa aparente da cisteíno-protease CPB, encontrada em abundância nas formas amastigotas das espécies do complexo *L. mexicana* e envolvida na supressão da reposta Th1 (MOTTRAM *et al.*, 1997). Aparentemente, a única protease detectada no extrato de *L. braziliensis* (63 kDa) também pode ser visualizada no extrato de *L. amazonensis*. Essas bandas encontradas nas duas espécies podem representar a gp63 (glicoproteína de 63 kDa ou leishmanolisina), que é uma metalo-protease encontrada em todas as espécies de *Leishmania* identificadas até o momento (AZIZI *et al.*, 2009; YAO *et al.*, 2003). Como amplamente descrito, a gp63 atua em diversos processos do ciclo de vida do parasito (MCGWIRE *et al.*, 2003; GARCIA *et al.*, 1997; BRITTINGHAM *et al.*, 1995; HEY *et al.*, 1994).

Recentemente, foi demonstrado que cepas virulentas de *L. braziliensis* expressam quantidades maiores de CPB do que as cepas não virulentas da mesma espécie (LIMA *et al.*, 2009). O fato de detectarmos uma molécula com massa similar à CPB no ELa, e não no ELb, juntamente com os dados produzidos por Lima e colaboradores (2009), suportam a ideia de que a imunização de BALB/c com proteases de *L. amazonensis* é capaz de agravar a infecção causada por uma cepa não virulenta de *L. braziliensis*.

Para a identificação dos fatores de *L. amazonensis* envolvidos no agravamento da doença em modelo murino de leishmaniose tegumentar (SILVA *et al.*, 2010), o conteúdo do ELa foi fracionado por cromatografia líquida em coluna de

troca aniônica. O processo mostrou-se reprodutível, visto que os cinco procedimentos independentes de purificação apresentaram resultados muito semelhantes entre si, como determinado pela quantidade e qualidade de proteínas nas frações obtidas (dados não mostrados). A análise zimográfica das frações mostrou que, aparentemente, todas as proteases detectadas no ELa foram recuperadas após a cromatografia. Interessantemente, após o fracionamento do ELa, uma banda com massa aparente de 37 kDa, não observada no extrato total, foi detectada em duas frações cromatográficas adjacentes (A17 e A18). Essa nova zona de proteólise pode resultar da ação do produto da clivagem de uma protease com maior massa molecular ou pode ser resultante da atividade de uma protease que é inibida por moléculas presentes no extrato total, porém ausentes nas frações A17 e A18.

Após as análises em gel (estimativa de massa molecular e avaliação de atividade enzimática), as frações do ELa foram reunidas em quatro grupos principais, levando-se em conta as similaridades de padrões proteicos e as atividades proteolíticas compartilhadas. Todas as proteases de *L. amazonensis* foram agrupadas nas frações 3 e/ou 4 (**Figura 4**).

Os dados obtidos por Silva e colaboradores (submetido para publicação) foram reproduzidos no presente trabalho, já que o tratamento com o extrato total de *L. amazonensis* aumentou significativamente a suscetibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *L. braziliensis*. Com exceção da fração 1, todas as outras frações (frações 2, 3 e 4), foram capazes, assim como o extrato total, de agravar significativamente a doença causada por *L. braziliensis*. Portanto, o fator responsável pela exacerbação da infecção está contido nas frações 2, 3 e 4 ou existem dois ou mais fatores distribuídos nessas frações. Em face às diferenças nas

composições de proteínas/proteases encontradas entre as frações 2, 3 e 4, a segunda proposição é a mais provável. Corroborando essa hipótese, o efeito agravante do extrato de *L. amazonensis* no sistema de infecção por *L. amazonensis* (homólogo) (DE MATOS GUEDES *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2007; PINHEIRO *et al.*, 2005) ou por *L. braziliensis* (heterólogo) (SILVA *et al.*, submetido para publicação) foi atribuído a diversos fatores, como cisteíno-proteases, serino-proteases, LPG, além de outras moléculas (hidro)solúveis ainda desconhecidas. Ao analisar a composição molecular das frações utilizadas *in vivo*, é possível observar que: (i) a fração 2 não apresenta proteínas com atividade gelatinolítica, contudo, contém duas proteínas de baixo peso molecular (21 kDa a 14 kDa), que podem estar envolvidas no fenômeno de agravamento da infecção; (ii) além de apresentar grande diversidade proteica, a fração 3 apresenta todas as proteases do ELa e é a única que contém uma protease de 68 kDa, possivelmente uma serino-protease envolvida no agravamento da infecção de camundongos BALB/c por *L. amazonensis* (DE MATOS GUEDES *et al.*, 2010); (iii) a análise zimográfica da fração 4 evidenciou a presença, em alta concentração, de uma protease com a mesma massa aparente (28 kDa) da cisteíno-protease CPB, que está envolvida na supressão da imunidade protetora contra *Leishmania*. Procedimentos de purificação e identificação das proteínas presentes nas frações ativas já estão sendo conduzidos em nosso laboratório.

Os nossos resultados mostraram que o tratamento *in vitro* com o ELa foi capaz de suprimir a produção basal de TNF- α em macrófagos. Porém, o ELa não foi capaz de alterar as produções basais das demais citocinas analisadas (IL-12p70, IL-6 e IL-10) e do NO. Apesar de não observamos redução da produção basal de NO *in vitro*, há evidências de que *in vivo*, na presença de fatores como IFN- γ , o TNF- α é

crucial para a produção de NO, o que torna os macrófagos capazes de destruir a *Leishmania* (FONSECA *et al.*, 2003; CARRERA *et al.*, 1996). Outras evidências sugerem que camundongos resistentes à infecção por *L. major*, quando tratados com anticorpos anti-TNF- α , desenvolvem lesões mais extensas e aumento da carga parasitária (DE KOSSODO *et al.*, 1994; LIEW *et al.*, 1990). Portanto, a supressão da produção de TNF- α em macrófagos por moléculas de *L. amazonensis* pode estar envolvida no agravamento da leishmaniose tegumentar, descrito por Silva e colaboradores (submetido para publicação).

A ativação de macrófagos por citocinas associadas às respostas inflamatórias ou por produtos de origem microbiana, como o LPS, resultam na indução e liberação de diversos fatores envolvidos no desenvolvimento da imunidade contra patógenos intracelulares. Em macrófagos, o LPS estimula a ativação simultânea de MAPK/ERK, JNK e NF κ B (FENG *et al.*, 1999). Esses fatores têm papéis diferenciais na regulação da expressão de genes que codificam uma série de citocinas, como a IL-12 (GRISCAVAGE *et al.*, 1996; MURPHY *et al.*, 1995) e a IL-10 (YANG *et al.*, 2009), além de regularem a expressão da iNOS (XIE *et al.*, 1994). Cameron e colaboradores (2004) mostraram que *L. mexicana* é capaz de degradar MAPK/ERK e NF- κ B, indicando que a *Leishmania* pode promover uma supressão generalizada da resposta inflamatória. Nossos achados corroboram esses dados, já que, após a ativação dos macrófagos com LPS, o ELa foi capaz de suprimir globalmente a produção de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-12p70 e IL-6, e NO.

A supressão de TNF- α , como discutido acima, pode ter sérias implicações para o agravamento da doença, já que ele é crucial para a expressão da iNOS e, portanto, está envolvido indiretamente na indução do estado de ativação do macrófago. Após a ativação dos macrófagos, o ELa também foi capaz de inibir a

produção de NO. Moléculas de *L. major*, como GIPLs (glicoinositolfosfolipídios) e LPG são capazes de inibir a síntese de NO em macrófagos, facilitando a sobrevivência do parasito dentro dos fagolisosomos das células fagocíticas (PROUDFOOT *et al.*, 1996, 1995).

A IL-6 é uma citocina produzida por uma grande variedade de células, inclusive por macrófagos. Diversas evidências indicam que a IL-6 promove a diferenciação de células Th2 e inibe a diferenciação de células Th1 (DIEHL & RINCON, 2002). Estudos prévios mostraram que o pré-tratamento de macrófagos humanos *in vitro* com IL-6 inibe a capacidade leishmanicida dessas células, após a ativação por IFN- γ e TNF- α (HATZIGEORGIU *et al.*, 1993). A IL-6 também é capaz de inibir a expressão de receptores de membrana para TNF- α (BERMUDEZ *et al.*, 1992). Castellucci e colaboradores (2006) observaram o aumento do risco de desenvolvimento da leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) em pacientes cujos macrófagos produziam pequenas quantidades de IL-6. Esse estudo evidenciou a capacidade da IL-6 em bloquear as expressões de IFN- γ e TNF- α , que são os principais fatores causadores do dano tecidual na LCM.

As possíveis implicações sobre a capacidade do bloqueio de IL-6 em células fagocíticas pela *Leishmania* devem ser cuidadosamente avaliadas, uma vez que, Silva e colaboradores (submetido para publicação) mostraram que o tratamento de camundongos BALB/c com moléculas de *L. amazonensis* agravou a leishmaniose cutânea através da promoção da resposta Th2.

Como mostrado no presente trabalho (**Figura 8B**) e amplamente descrito na literatura, moléculas de *Leishmania* são capazes de suprimir a produção de IL-12 em macrófagos ativados. A CPB e o LPG de *Leishmania* são capazes de inibir a produção de IL-12 por dois mecanismos distintos. A translocação do NF κ B para o

núcleo, após a ativação com LPS, aumenta a transcrição de IL-12 em macrófagos. A cisteíno-protease CPB de *Leishmania* cliva componentes do NF κ B e consequentemente inibe a transcrição de IL-12 (CAMERON *et al.*, 2004). Estudos mostram que o LPG regula a produção de IL-12 independentemente do NF κ B (FENG *et al.*, 1999). O LPG é capaz de ativar ERK, que indiretamente bloqueia a produção de IL-12 em macrófagos, possivelmente pela indução da produção de IL-10. Em macrófagos, a transcrição do gene que codifica a IL-10 depende da ativação de ERK (YANG *et al.*, 2007).

Diversas evidências sugerem que a IL-10 reduz a produção de TNF- α e IL-12 em macrófagos ativados (DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1991; FIORENTINO *et al.*, 1991), possibilita o desenvolvimento da resposta Th2 (através do bloqueio da produção de IL-12 em células apresentadoras de antígenos) (O'GARRA & MURPHY, 2009) e inibe a produção de NO em macrófagos ativados por IFN- γ (VIETH *et al.*, 1994; GAZZINELLI *et al.*, 1992). Em humanos, a IL-10 tem papel agravante na infecção causada por *L. braziliensis* (SALHI *et al.*, 2008). Em modelos murinos de leishmanioses cutânea (CHATELAIN *et al.*, 1999; KANE & MOSSER, 2001) e visceral (MURRAY *et al.*, 2005), a IL-10 contribui para o agravamento da doença. As lesões em camundongos que não expressam essa interleucina são significativamente menores do que as lesões nos animais que expressam a IL-10 normalmente (BUXBAUM & SCOTT, 2005; KANE & MOSSER, 2001).

Os nossos dados mostram que somente o estímulo com o ELa não foi suficiente para induzir a produção de IL-10 em macrófagos (**Figura 6D**). A ativação por LPS foi requerida para que o ELa fosse capaz de induzir a produção ótima dessa citocina *in vitro* (**Figura 8D**). Esse coestímulo pode ser fisiologicamente relevante, visto que, frequentemente, bactérias são encontradas em grande número nas lesões

cutâneas de pacientes e de animais experimentalmente infectados (EL-ON *et al.*, 1992). Além disso, foi mostrado que fragmentos de hialuronano, um dos principais componentes da matriz extracelular, gerados pela destruição tecidual, são capazes de ativar a via TLR-4 em células dendríticas (TERMEER *et al.*, 2002). O estímulo com hialuronano induz a produção de IL-10 em macrófagos na presença de amastigotas de *L. amazonensis* opsonizadas (YANG *et al.*, 2009). Adicionalmente, foi mostrado que a elastase de neutrófilos é capaz de ativar macrófagos através do TLR-4 (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2007).

A fração 3, que aumentou a suscetibilidade de BALB/c à infecção por *L. braziliensis*, foi capaz de suprimir significativamente a produção de TNF- α em macrófagos *in vitro*. Deste modo, a supressão da produção de TNF- α por moléculas de *Leishmania* pode ser um importante fator envolvido no agravamento da infecção leishmaniótica, descrito por Silva e colaboradores (submetido para publicação). Outros mecanismos não avaliados no presente estudo devem participar do agravamento da infecção, já que as frações 2 e 4, capazes de alterar o curso da infecção por *L. braziliensis in vivo*, não foram capazes de alterar a produção de citocinas em macrófagos. Ao contrário, o tratamento com a fração 4 aumentou a produção de NO em macrófagos, o que pode implicar no aumento da capacidade microbicida dessas células. Nenhuma das frações, obtidos após o fracionamento do ELa em coluna de troca iônica, foi capaz de suprimir globalmente a produção de citocinas pró-inflamatórias e NO e aumentar a produção de IL-10, como demonstrado *in vitro* pelo ELa, em macrófagos ativado por LPS. A ação das moléculas não aderidas à coluna (efluente) também foi avaliada, porém, não foi detectada atividade em macrófagos ativado *in vitro* (dados não mostrados). Deste modo, é possível supor que duas ou mais moléculas presentes no ELa atuam

sinergicamente alterando as produções de citocinas e NO em macrófagos ativados. É provável que o reagrupamento de todas as frações purificadas do ELa reconstitua a atividade demonstrada pelo extrato total *in vitro*.

Novos estudos já estão sendo conduzidos em nosso laboratório para avaliar a atividade das moléculas de *L. amazonensis* em outros componentes do sistema imune. A identificação e a elucidação dos mecanismos de ação dos fatores capazes de agravar a infecção por *Leishmania* podem ser determinantes para o desenvolvimento de vacinas contra leishmanioses ou, dependendo do grau de especificidade dos fatores, de estratégias para o combate de patógenos intracelulares e/ou para a imunomodulação terapêutica de doenças autoimunes e alérgicas.

8. CONCLUSÕES / SUMÁRIO DE RESULTADOS

- Os tratamentos de camundongos BALB/c com frações distintas de um extrato de *L. amazonensis* são capazes, assim como o extrato total, de agravar a doença causada por *L. braziliensis*. Em face às diferenças nas composições de moléculas encontradas entre frações com efeito biológico, é provável que dois ou mais fatores estejam envolvidos no agravamento da infecção.

- O ELa por si só não é capaz de induzir a produção de IL-10 em macrófagos. O coestímulo com LPS e ELa é requerido para a produção dessa citocina *in vitro*, levantando a interessante possibilidade que o estímulo do TLR-4 por bactérias comumente presentes na pele ou por outras moléculas do hospedeiro participe do desenvolvimento da infecção leishmaniótica.

- Os tratamentos *in vitro* com o ELa ou com uma das frações purificadas suprimem a produção de TNF- α em macrófagos. Esse fenômeno pode estar envolvido na exacerbação da infecção por *L. braziliensis* em BALB/c.

- Nenhuma das frações obtidas é capaz de ter o efeito global sobre macrófagos ativados do ELa (suprimir a produção de e NO e aumentar a produção de IL-10), indicando que duas ou mais moléculas presentes no ELa atuam sinergicamente exercendo o efeito biológico sobre macrófagos.

- Duas das frações purificadas, apesar de não alterarem a produção de citocinas em macrófagos, não foram capazes de alterar o curso da infecção por *L.*

braziliensis in vivo. Portanto, é provável que outros mecanismos não avaliados no presente estudo, independente da ação direta de moléculas da *Leishmania* sobre macrófagos, estejam envolvidos no agravamento da infecção.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander, J., Coombs, G. H., & Mottram, J. C. (1998). *Leishmania mexicana* cysteine protease-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *The Journal of Immunology*, 161: 6794-6801.

Almeida, R., Barral-Netto, M., De Jesus, A., Freitas, L. A., Carvalho, E., & Barral, A. (1996). Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolates from humans with cutaneous, mucosal or visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 54: 178-184.

Almeida-Campos, F. R., & Horta, M. F. (2000). Proteolytic activation of leishporin: evidence that *Leishmania amazonensis* and *Leishmania guyanensis* have distinct inactive forms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 111: 363-375.

Andrade, A. S. R., Santoro, M. M., Melo, M. N., & Mares-Guia, M. (1998). *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Purification and Enzymatic Characterization of a Soluble Serine Oligopeptidase from Promastigotes. *Experimental Parasitology*, 89: 153-160.

Argueta-Donohué, J., Carrillo, N., Valdés-Reyes, L., Zentella, A., Aguirre-García, M., Becker, I., & Gutiérrez-Kobeh, L. (2008). *Leishmania mexicana*: Participation of NF- κ B in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG). *Experimental Parasitology*, 120: 1-9.

Azizi, H., Hassani, K., Taslimi, Y., Najafabadi, H. S., Papadopoulou, B., & Rafati, S. (2009). Searching for virulence factors in the non-pathogenic parasite to humans *Leishmania tarentolae*. *Parasitology*, 136: 723-735.

Balestieri, F. M. P., Costa, V. M. A., Queiroz, A. R. P., Barral-Netto, M., Scavone, C., & Abrahamsohn, I. A. (2002). *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes and Infection*, 4: 23-29.

Barral, A., Costa, J. M. L., Bittencourt, A. L., Barral-Netto, M., & Carvalho, E. M. (1995). Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil – clinical and immunopathologic aspects. *International Journal of Dermatology*, 34: 474-479 (a).

Barral, A., Guerreiro, J., Bomfim, G., Correia, D., Barral-Netto, M., & Carvalho, E. M. (1995). Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53: 256-259 (b).

Barral-Netto, M., Barral, A., Brownell, C. E., Skeiky, Y. A., Ellingsworth, L. R., Twardzik, D. R., & Reed S. G. (1992). Transforming growth factor- β in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science*, 257: 545-548.

Bart, G., Frame, M. J., Carter, R., Coombs, G. H., & Mottram, J. C. (1997). Cathepsin B-like cysteine protease-deficient mutants of *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 88: 53-61.

Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L. G., Ruiz, A., Cervantes, R., Torres, A. P., Cabrera, N., Gonzalez, A., Maldonado, C., & Isibasi, A. (2003). *Leishmania* lipophosphoglycan activates NK cells through toll-like receptor-2. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 130: 65-74.

Belkaid, Y., Butcher, B., & Sacks, D. L. (1998). Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *European Journal of Immunology*, 28: 1389-1400.

Bermudez, L. E., Wu, M., Petrofsky, M., & Young, L. S. (1992). Interleukin-6 antagonizes tumor necrosis factor-mediated mycobacteriostatic and mycobactericidal activities in macrophages. *Infection and Immunity*, 60: 4245-4252.

Beyrodt, C., Prestes, G., Pinto, A. R., Freymuller, E., & Barbiéri, C. L. (1997). Characterization of an antigen from *Leishmania amazonensis* amastigotes able to elicit protective response in murine model. *Infection and Immunity*, 63: 2052-2059.

Bittencourt, A., & Barral-Netto, M. (1995). Leishmaniasis. In: DOERR, W. S. G. (Org.). *Tropical Pathology*. 2nd ed. Berlin: Springer, 597-651.

Blackwell, J. M. (1999). Tumour necrosis factor alpha and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasitology Today*, 15: 73-76.

Bogdan, C., Rollinghoff, M., & Diefenbach, A. (2000). The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunological Reviews*, 173: 17-26.

Bogdan, C., Schroppel, K., Lohoff, M., Rollinghoff, M., & Solbach, W. (1990). Immunization of susceptible hosts with a soluble antigen fraction from *Leishmania major* leads to aggravation of murine leishmaniasis mediated by CD4⁺ T cells. *European Journal of Immunology*, 20: 2533-2540.

Braun-Breton, C., Blisnick, T., Jouin, H., Barale, J. C., Rabilloud, T., Langsley, G., & Pereira-Da-Silva, L. H. (1992). *Plasmodium chabaudi* p68 serine protease activity required for merozoite entry into mouse erythrocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 88: 9647-9651.

Brewig, N., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Veit, A., Bickert, T., Fleischer, B., Mostbo, S., & Ritter, U. (2009). Priming of CD8⁺ and CD4⁺ T Cells in Experimental

Leishmaniasis Is Initiated by Different Dendritic Cell Subtypes. *The Journal of Immunology*, 182: 774-783.

Brittingham, A., Morrison, C. J., McMaster, W. R., McGwire, B. S., Chang, K. P., & Mosser, D. M. (1995). Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *The Journal of Immunology*, 155: 3102-3111.

Burleigh, B. A., & Andrews, N. W. (1995). A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca^{2+} -signaling factor for mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 5172-5180.

Burleigh, B. A., Caler, E. V., Webster, P., & Andrews, N. (1997). A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca^{2+} signaling in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 136: 609-620.

Buxbaum, L. U., Denise, H., Coombs, G. H., Alexander, J., Mottram, J. C., & Scott, P. (2003). Cysteine protease B of *Leishmania mexicana* inhibits host Th1 responses and protective immunity. *The Journal of Immunology*, 171: 3711-3717.

Cameron, P., McGachy, A., Anderson, M., Paul, A., Coombs, G. H., Mottram, J. C., 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. *The Journal of Immunology*, 173: 3297-3304.

Campos, M. B., Gomes, C. M. C., De Souza, A. A. A., Lainson, R., Corbett, C. E. P., & Silveira, F. T. (2008). *In vitro* infectivity of species of *Leishmania* (*Viannia*) responsible for American cutaneous leishmaniasis. *Parasitology Research*, 108: 771-776.

Carrera, L., Gazzinelli, R. T., Badolato, R., Hieny, S., Muller, W., Kuhn, R., & Sacks, D. L. (1996). *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 183: 515-526.

Carvalho, E. M., Correia-Filho, D., Bacelar, O., Lessa, H., & Rocha, H. (1995). Characterization of the immune response in subjects with self healing cutaneous leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53: 273-277.

Carvalho, E. M., Johnson, W. D., Barreto, E., Marsden, P. D., Costa, J. M. L., Reed, S., & Rocha, H. (1985). Cell-mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, 135: 4144-4148.

Castellucci, L., Menezes, E., Oliveira, J., Magalhães, A., Guimarães, L. H., Lessa, M., Ribeiro, S., Reale, J., Noronha, E. F., Wilson, M. E., Duggal, P., Beaty, T. H., Jerônimo, S., Jamieson, S. E., Bales, A., & Blackwell, J. M., de Jesus, A. R., &

Carvalho, E. M. (2006). IL6-174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *The Journal of Infectious Diseases*, 194: 519-527.

Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J., & Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews of Microbiology*, 5: S5-S16.

Chatelain, R., Mauze, S., & Coffman, R. L. (1999). Experimental *Leishmania major* infection in mice: role of IL-10. *Parasite Immunology*, 21: 211-218.

Chen, D. Q., Kolli, B. K., Yadava, N., Lu, H. G., Gilman-Sachs, A., Peterson, D. A., & Chang, K. P. (2000). Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages *in vitro*. *Infection and Immunity*, 68: 80-86.

Choudhury, R., Bhaumik, S. K., De, T., & Chakraborti, T. (2009). Identification, purification, and characterization of a secretory serine protease in an Indian strain of *Leishmania donovani*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 320: 1-14.

Choudhury, R., Das, P., Bhaumik, S. K., De, T., & Chakraborti, T. (2010). *In situ* immunolocalization and stage-dependent expression of a secretory serine protease in *Leishmania donovani* and its role as a vaccine candidate. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(4): 660-7.

Coffman, R. L., Chatelain, R., Leal, L. M., & Virile, K. (1991). *Leishmania major* infection in mice: a model system for the study of CD4⁺ T-cell subset differentiation. *Immunologic Research*, 142: 36-40.

Corradin, S., Ransijn, A., Corradin, G., Roggero, M. A., Schmitz, A. A., Schneider, P., Mauël, J., & Vergères, G. (1999). MARCKS-related protein (MRP) is a substrate for the *Leishmania major* surface protease leishmanolysin (gp63). *Journal of Biological Chemistry*, 274: 25411-25418.

Costa, J. M. L. (2005). Epidemiology of the leishmaniasis in Brazil. *Gazeta Médica da Bahia*, 75: 3-17.

Davies, C. R., Cooper, A. M., Peacock, C., Lane, R. P., & Blackwell, J. M. (1990). Expression of LPG and GP63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sand fly *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology*, 101: 337-356.

Davies, C. R., Kaye, P., Croft, S. L., & Sundar, S. (2003). Leishmaniasis: new approaches to disease control. *British Medical Journal*, 326: 377-382.

De Kossodo, S., Grau, G. E., Louis, J. A., & Müller, I. (1994). Tumour necrosis factor alpha (TNF- α) and TNF- β and their receptors in experimental cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 62: 1414-1420.

De Matos Guedes, H. L., Pinheiro, R. O., Chaves, S.P., Giovani-De-Simone, S., & Rossi-Bergmann, B. (2010). Serine proteases of *Leishmania amazonensis* as immunomodulatory and disease-aggravating components of the crude LaAg vaccine. *Vaccine*, 28(33): 5491-5496.

De Veer, M. J., Curtis, J. M., Baldwin, T. M., Didonato, J. A., Sexton, A., McConville, M. J., Handman, E., & SchoWeld, L. (2003). MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and toll-like receptor 2 signalling. *European Journal of Immunology*, 33: 2822-2831.

de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., & de Vries, V. (1991). Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 174: 1209-1220.

DeKrey, G. K., Lima, H. C., & Titus R. G. (1998). Analysis of the immune response of mice infection with *Leishmania braziliensis*. *Infection and Immunity*, 66: 827-829.

Descoteaux, A., & Matlashewski, G. (1989). c-fos and tumor necrosis factor gene expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Molecular Cell Biology*, 9: 5223-5227.

Desjeux, P. (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95: 239-243.

Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27: 305-318.

Diehl S., & Rincon, M. (2002). The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Molecular Immunology*, 39: 531-536.

Duboise, S. M., Vannier-Santos, M. A., Costa-Pinto, D., Rivas, L., Pan, A. A., Traub-Cseko, Y. M., de Souza, W. & McMahon-Pratt, D. (1994). The biosynthesis, processing, and immunolocalization of *Leishmania pifanoi* amastigote cysteine proteinases. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 68: 119-132.

el-On, J., Sneier, R., & Elias, E. (1992). *Leishmania major*: bacterial contamination of cutaneous lesions in experimental animals. *Israel Journal of Medical Sciences*, 28: 847-851.

Evans, T. G., Thai, L., Granger, D. L., & Hibbs Jr, J. B. (1993). Effect of *in vivo* inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, 151: 907-915.

Feng, G. J., Goodridge, H. S., Harnett, M. M., Wei, X. Q., Nikolaev, A. V., Higson, A. P., & Liew, F. Y. (1999). Extracellular Signal-Related Kinase (ERK) and

p38 Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinases Differentially Regulate the Lipopolysaccharide-Mediated Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase and IL-12 in Macrophages: *Leishmania* Phosphoglycans Subvert Macrophage IL-12 Production by Targeting ERK MAP Kinase. *The Journal of Immunology*, 163: 6403-6412.

Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M., & O'Garra, A. (1991). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *The Journal of Immunology*, 147: 3815-3822.

Fonseca, S. G., Romão, P. R., Figueiredo, F., Morais, R. H., Lima, H. C., Ferreira, S. H., & Cunha, F. Q. (2003). TNF- α mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. *European Journal of Immunology*, 33: 2297-2306.

Frame, M. J., Mottram, J. C., & Coombs, G. H. (2000). Analysis of the roles of cysteine proteases of *Leishmania mexicana* in the host-parasite interaction. *Parasitology*, 121(4): 367-377.

Garcia, M. R., Graham, S., Harris, R. A., Beverley, S. M., & Kaye, P. M. (1997). Epitope cleavage by *Leishmania* endopeptidase(s) limits the efficiency of the exogenous pathway of major histocompatibility complex class I-associated antigen presentation. *European Journal of Immunology*, 27: 1005-1013.

Gazzinelli, R. T., Oswald, I. P., James, S. L., & Sher, A. (1992). IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- γ -activated macrophages. *The Journal of Immunology*, 148: 1792-1796.

Gorak, P. M., Engwerda, C. R., & Kaye, P.M., (1998). Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *European Journal of Immunology*, 28: 687-695.

Gregory, D. J., & Olivier, M. (2005). Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology*, 130: S27-S35.

Grimaldi Jr., G., Tesh, R. B., & McMahon-Pratt, D. (1989). A review of the geographical distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41: 687-725.

Griscavage, J. M., Wilk, S., & Ignarro, L. J. (1996). Inhibitions of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF κ B. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 93: 3308.

Guerin, P. J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S. L., Desjeux, P., Wasunna, M. K., & Bryceson, A. D. (2002). Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases*, 2: 494-501.

Hatzigeorgiou, D. E., He, S., Sobel, J., Grabstein, K. H., Hafner, A., & Ho, J. L. (1993). IL-6 down-modulates the cytokine-enhanced antileishmanial activity in human macrophages. *The Journal of Immunology*, 151: 3682-3692.

Herwaldt, B. L. (1999). Leishmaniasis. *Lancet*, 354: 1191-1199.

Hey, A. S., Theander, T. G., Hviid, L., Hazrati, S. M., Kemp, M., & Kharazmi, A. (1994). The major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major* and *Leishmania donovani* cleaves CD4 molecules on human T cells. *The Journal of Immunology*, 152: 4542-4548.

Ji, J., Masterson, J., Sun, J., & Soong, L. (2005). CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells Restrain Pathogenic Responses during *Leishmania amazonensis* Infection. *The Journal of Immunology*, 174: 7147-7153.

Ji, J., Sun, J., & Soong, L. (2003). Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity*, 71: 4278-4288.

John, B., & Hunter, C. A. (2008). Neutrophil soldiers or Trojan horses? *Science*, 321: 917-918.

Jorens, P. G., Matthys, K. E., & Bult, H. (1995). Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages, *Medical Inflammation*, 4: 75-89.

Joshi, P. B., Kelly, B. L., Kamhawi, S., Sacks, D. L., & McMaster, W. R. (2002). Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 120: 33-40.

Joshi, P. B., Sacks, D. L., Modi, G., & McMaster, W. R. (1998). Targeted gene deletion of *Leishmania major* genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (GP63). *Molecular Microbiology*, 27: 519-530.

Julia, V., Rassoulzadegan, M., & Glaichenhaus, N. (1996). Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science*, 274: 421-423.

Kane, M. M., & Mosser, D. M. (2001). The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, 166: 1141-1147.

Kaye, P. M., Curry, A. J., & Blackwell, J. M. (1991). Differential production of Th1 and Th2 derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, 146: 2763-2770.

Kenney, R. T., Sacks, D. L., Sypek, J. P., Vilela, L., Gam, A. A., & Evans-Davis, K. (1999). Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as

adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, 163: 4481-4488.

Khamesipour, A., Dowlati, Y., Asilian, A., Hashemi-Fesharki, R., Javadi, A., Noazin, S., & Modabber, F. (2005). Leishmanization: use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. *Vaccine*, 23: 3642-8.

Kima, P. E. (2007). The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *International Journal for Parasitology*, 37: 1087-1096.

Konecny, P., Stagg, A. J., Jebbari, H., English, N., Davidson, R. N., & Knight, S. C., (1999). Murine dendritic cells internalize *Leishmania major* promastigotes, produce IL-12 p40 and stimulate primary T cell proliferation *in vitro*. *European Journal of Immunology*, 29: 1803-1811.

Kroeger, A., Avila, E. V., & Morison, L. (2002). Insecticide impregnated curtains to control domestic transmission of cutaneous leishmaniasis in Venezuela: cluster randomised trial. *British Medical Journal*, 325: 810-813.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Lainson, R. (1987). Further comments on cutaneous leishmaniasis in Belize, Central America. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 702.

Lainson, R., & Shaw, J. J. (1978). Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. *Nature*, 273: 596-600.

Lara, M. L., Layrisse, Z., Scorsa, J. V., Garcia, E., Stoikow, Z., Granados, J., & Bias, W. (1991). Immunogenetics of human American cutaneous leishmaniasis. Study of HLA haplotypes in 24 families from Venezuela. *Human Immunology*, 30: 129-135.

Laskay, T., Van Zandbergem, G., & Solbach, W. (2008). Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology*, 213: 183-191.

Launois, P., Maillard, I., Pingel, S., Swihart, K. G., Xenarios, I., Acha-Orbea, H., Diggelmann, H., Locksley, R. M., MacDonald, H. R., & Louis, J. A. (1997). IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4⁺ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity*, 6: 541-549.

Liew, F. Y., Hale, C., & Howard, J. G. (1985). Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. IV. Subcutaneous immunization prevents the

induction of protective immunity against fatal *Leishmania major* infection. *The Journal of Immunology*, 135: 2095-2101.

Liew, F. Y., Li, Y. & Millot, S. (1990). Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *The Journal of Immunology*, 145: 4305-4310.

Lima, A. K. C., Elias, C. G. R., Souza, J. E. O., Santos A. L. S., & Dutra, P. M. L. (2009). Dissimilar peptidase production by avirulent and virulent promastigotes of *Leishmania braziliensis*: inference on the parasite proliferation and interaction with macrophages. *Parasitology*, 136(10):1179-1191.

Lima, H. C., Bleyenbergh, J. A., & Titus, R. G. (1997). A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. *Parasitology Today*, 13: 80-82.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.

Marovich, M. A., McDowell, M. A., Thomas, E. K., & Nutman, T. B. (2000). IL-12p70 production by *Leishmania major*-harboring human dendritic cells is a CD40/CD40 ligand-dependent process. *The Journal of Immunology*, 164, 5858-5865.

Marsden, P. D. (1990). Mucocutaneous leishmaniasis, *British Medical Journal*, 301: 656-657.

Matte, C., & Olivier, M. (2002). *Leishmania*-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. *Journal of Infectious Disease*, 185, 673-681.

McGwire, B. S., Chang, K. P., & Engman, D. M. (2003). Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infection and Immunity*, 71: 1008-1010.

Mckerrow, J. H., Sun, E., Rosenthal, P. J., & Bouvier, J. (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa parasite. *Annual Review of Microbiology*, 47: 821-853.

Mcmahon-Pratt, D., Kima, P. E., & Soong, L. (1998). *Leishmania* amastigote target antigens: the challenge of a stealthy intracellular parasite. *Parasitology Today*, 14: 31-34.

Migliorini, P., Corradin, G., & Corradin, S. B. (1991). Macrophage NO₂⁻ production as a sensitive and rapid assay for the quantitation of murine IFN-gamma. *Journal of Immunological Methods*, 139: 107-114.

Mocci, S., & Coffman, R. (1995). Induction of a Th2 population from a polarized *Leishmania*-specific Th1 population by *in vitro* culture with IL-4. *The Journal of Immunology*, 154: 3779-3787.

Morgado-Díaz, J. A., Silva-Lopez, R. E., Alves, C. R., Soares, M. J., Corte-Real, S., & Giovanni-De-Simone, S. (1998). Subcellular localization of an intracellular serine protease of 68 kDa in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(4): 377-383.

Mottram, J. C., Coombs, G. H., & Alexander, J. (2004). Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Current Opinion in Microbiology*, 7: 375-381.

Mottram, J. C., Frame, M. J., Brooks, D. R., Tetley, L., Hutchison, J. E., Souza, A. E., & Coombs, G. H. (1997). The multiple *cpb* cysteine protease genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 14285-14293.

Mottram, J. C., Souza, A. E., Hutchison, J. E., Carter, R., Frame, M. J., & Coombs, G. H. (1996). Evidence from disruption of the *Imcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteases are virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 93: 6008-6013.

Murphy, T. L., Cleveland, M. G., Kulesza, P., Magram, J., & Murphy, K. M. (1995). Regulation of interleukin-12 p40 expression through an NF- κ B half-site. *Molecular and Cellular Biology*, 15: 5258-5267.

Murray, H. W., & Nathan, C. F. (1999). Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *The Journal of Experimental Medicine*, 189; 741-746.

Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., & Saraiva, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 366: 1561-1576.

O'Garra A., & Murphy, K. M. (2009). From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce T(H)1 development. *Nature Immunology*, 10(9): 929-32.

Peters, C. P., & Sacks, D. L. (2009). The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cellular Microbiology*, 11(9), 1290-1296.

Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M. P., Germain, R. N., & Sacks, D. (2008). *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophil in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, 321: 970-974.

Petzi-Erler, M. L., Belich, M. P., & Queiroz-Telles, F. (1991). Association of mucosal leishmaniasis with HLA. *Human Immunology*, 32: 254-260.

Pinheiro, R. O., Pinto, E. F., de Matos Guedes, H. L., Agrellos Filho, O. A., Mattosa, K. A. Saraiva, E. M., Mendonça, S. C. F., & Rossi-Bergmann, B (2007). Protection against cutaneous leishmaniasis by intranasal vaccination with lipophosphoglycan. *Vaccine*, 25: 2716-2722.

Pinheiro, R. O., Pinto, E. F., Lopes, J. R. C., Guedes, H. L. M., Fentanes, R. F., & Rossi-Bergmann, B. (2005). TGF- β -associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. *Microbes and Infection*, 7: 1317-1323.

Pinto, A. R., Beyrodt, C. G., Lopes, R. A., & Barbiéri, C. L. (2000). Identification of a 30 kDa antigen from *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes implicated in protective cellular responses in a murine model. *International Journal of Parasitology*, 30: 599-607.

Prina, E., Abdi, S. Z., Lebastard, M., Perret, E., Winter, N., & Antoine, J. C. (2003). 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. *Journal of Cell Science*, 117: 315-325.

Proudfoot L., Nikolaev, A. V., Feng, G. J., Wei, W. Q., Ferguson, M. A., Brimacombe, J. S., & Liew, F. Y. (1996). Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 93: 10984-10989.

Proudfoot, L., O'Donnell, C. A., & Liew, F. Y. (1995). Glycoinositol phospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *European Journal of Immunology*, 25: 745-750.

Pupkis, M. F., Tetley, L. & Coombs, G. H. (1986). *Leishmania mexicana*: amastigote hydrolases in unusual lysosomes. *Experimental Parasitology*, 62: 29-39.

Racoosin, E. L., & Beverley, S. M. (1997). *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. *Experimental Parasitology*, 85: 283-295.

Rafati, S., Couty-Joue, S., Alimohammadian, M. H., & Louis, J. A. (1997). Biochemical analysis and immunogenicity of *Leishmania major* amastigote fractions in cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology*, 110: 203-11.

Rawling, N. D., & Barret, A. J. (1994). Families of serine peptidases. In: Barret, A.J. (Ed.), Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidase. *Methods in Enzymology*, 244: 19-45.

Reiner, N. E. (1987). Parasite accessory cell-interactions in murine leishmaniasis.1. Evasion and stimulus-dependent suppression of the macrophage interleukin-1 response by *Leishmania donovani*. *The Journal of Immunology*, 138: 1919-1925.

Reiner, S. L., & Locksley, R. M., (1995). The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annual Review of Immunology*, 13: 151-177.

Reiner, S. L., Zheng, S., Wang, Z. E., Stowring, L., & Locksley, R. M. (1994). *Leishmania* Promastigotes Evade Interleukin 12 (IL-12) Induction by Macrophages and Stimulate a Broad Range of Cytokines from CD4⁺ T Cells during Initiation of Infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 179: 447-456.

Ribeiro-Gomes, F. L., Moniz-de-Souza, M. C., Alexandre-Moreira, M. S., Dias, W. B., Lopes, M. F., Nunes, M. P., Lungarella, G., & DosReis, G. A. (2007). Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *The Journal of Immunology*, 179(6): 3988-3994.

Roggwille, E., Bétouille, M. E. M., Blisnick, T., & Braun-Breton, C. (1996). A role for erythrocyte band 3 degradation by the parasite gp 76 serine protease in the formation of the parasitophorous vacuole during invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 82: 13-24.

Rosenthal, P. J. (1999). Proteases of protozoan parasites. *Advances in Parasitology*, 43: 105-159.

Sacks, D. L. (1989). Metacyclogenesis in *Leishmania* amastigotes. *Experimental Parasitology*, 69: 100-103.

Sacks, D. L., & da-Silva, R. P. (1987). The generation of infective stage *Leishmania major* promastigotes is associated with the cell-surface expression and release of a developmentally regulated glycolipid. *The Journal of Immunology*, 139: 3099.

Sacks, D. L., & Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology*, 55: 453-483.

Sacks, D. L., & Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews of Immunology*, 2: 845-857.

Sacks, D. L., & Perkins P. V. (1984). Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, 223: 1417.

Sajid, M., & Mckerrow, J. H. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 120: 1-21.

Salhi, A., Rodrigues, V. Jr., Santoro, F., Desein, H., Romano, A., Castellano, L. R., Sertorio, M., Rafati, S., Chevillard, C., Prata, A., Alçais, A., Argiro, & L., Desein, A. (2008). Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *The Journal of Immunology*, 180: 6139-6148.

Schilling, S., & Glaichenhaus, N. (2001). T cells that react to the immunodominant *Leishmania major* LACK antigen prevent early dissemination of the parasite in susceptible BALB/c mice. *Infection and Immunity*, 69: 1212-1214.

Seay, M. B., Heard, P. L., & Chaudhuri, G. (1996). Surface Zn-protease as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. *Infection and Immunity*, 64: 5129-5137.

Silva, M. G. S., Larangeira, D. F., Oliveira, P. R. S., Sampaio, R. B., Suzart, P., Nihei, J. S., Teixeira, M. C. A., Mengel J. O., dos-Santos, W. L. C., & Pontes-de-Carvalho, L. (2010). Enhancement of Experimental Cutaneous Leishmaniasis by *Leishmania* Molecules. I. Dependency on IL-4, Serine-Protease/Esterase Activity, and Parasite and Host Genetic Backgrounds. *Submetido para publicação..*

Silva-Lopez, R. E., & Giovanni-de-Simone, S. (2004). *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: purification and characterization of a promastigote serine protease. *Experimental Parasitology*, 107:173-182.

Silva-Lopez, R. E., Coelho, M. G. P., & Giovanni-de-Simone, S. (2005). Characterization of an extracellular serine protease of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitology*, 131: 85-96.

Silva-Lopez, R. E., Morgado-Díaz, J. A., Chávez, M. A. & Giovanni-De-Simone, S. (2007). Effects of serine protease inhibitors on viability and morphology of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. *Parasitology Research*, 101: 1627-1635.

Silveira, F. T., Lainson, R., & Corbett, C. E. P. (2004). Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 239-251.

Silveira, F. T., Lainson, R., Gomes, C. M. C., Laurenti, M. D., & Corbett, C. E. P. (2009). Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 31: 423-431.

Silveira, F. T., Lainson, R., Gomes, C. M. C., Laurenti, M. D., & Corbett, C. E. P. (2008). Reviewing the role of the dendritic Langerhans cell in the

immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102: 1075-1080.

Solbach, W., & Laskay, T. (2000). The host response to *Leishmania major*. *Advances in Immunology*, 74: 275-317.

Soong, L. (2008). Modulation of Dendritic Cell Function by *Leishmania* Parasites. *The Journal of Immunology*, 180: 4355-4360.

Soong, L., Chang, C. H., Sun, J., Longley, B. J., & McMahon-Pratt, D. Role of CD4 T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *The Journal of Immunology*, 158: 5374-5383.

Souza, A. E., Bates, P. A., Coombs, G. H., & Mottram, J. C. (1994). Null mutants for the *Imcpa* cysteine protease gene in *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 63: 213-220.

Spath, G. F., Garraway, L. A., Turco, S. J., & Beverley, S. M. (2003). The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 100: 9536-9541.

Stenger, S., Thüring, H., Rölinghoff, M., Manning, P., & Bogdan, C. (1995). L-N6-(1-iminoethyl)lysine potently inhibits inducible nitric oxide synthase and is superior to NG-monomethyl-arginine *in vitro* and *in vivo*. *European Journal of Pharmacology*, 294: 703-712.

Teixeira, M. C., De-Jesus, S. R., Sampaio, R. B., Pontes-De-Carvalho, L. C., & Dos-Santos, W. L. C. (2002). A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. *Parasitology Research*, 88(11): 963-968.

Terabe, M., Kuramochi, T., Ito, M., Hatabu, T., Sanjoba, C., Chang, K. P., & Matsumoto, Y. (2000). CD4 cells are indispensable for ulcer development in murine cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 68: 4574-4579.

Terabe, M., Kuramochi, T., Ito, M., Hatabu, T., Sanjoba, C., Chang, K. P., & Matsumoto, Y. (1999). Non-ulcerative cutaneous lesion in immunodeficient mice with *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitology International*, 48: 47-53.

Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C., & Simon, J. C. (2002). Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via Toll-like receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine*, 195: 99-111.

Turco, S. J., Späth, G. F., & Beverley, S. M. (2001). Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends in Parasitology*, 17(5): 223-226.

Vieth, M., Will, A., Schroppel, K., Rollinghoff, M., & Gessner, A. (1994). Interleukin-10 inhibits antimicrobial activity against *Leishmania major* in murine macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*, 40: 403-409.

von Stebut, E., Belkaid, Y., Jakob, T., Sacks, D. L., & Udey, M. C. (1998). Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 188: 1547-1552.

von Stebut, E., Belkaid, Y., Nguyen, B. V., Cushing, M., Sacks, D. L., & Udey, M. C. (2000). *Leishmania major*-infected murine Langerhans cell-like dendritic cells from susceptible mice release IL-12 after infection and vaccinate against experimental cutaneous Leishmaniasis. *European Journal of Immunology*, 30; 3498-3506.

Wei, X. Q., Charles, I. G., Smith, A., Ure, J., Feng, G. J., Huang, F. P., Xu, D., Müller, W., Moncada, S., & Liew F. Y. (1995). Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*, 375: 408-411.

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. *European Journal of Immunology*, 28: 2467-2477.

WHO. (2002). Weekly epidemiological record. 365-372.

Wilson, M. E., Hardin, K. K., & Donelson, J. E. (1989). Expression of the major surface glycoprotein of *Leishmania donovani chagasi* in virulent and attenuated promastigotes. *The Journal of Immunology*, 143: 678-684.

Xie, Q. W., Kashiwabara, Y., & Nathan, C., (1994). Role of transcription factor NF-kappaB/ Rel in induction of nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 4705-4708.

Yamey, G., & Toreele, E. (2002). The world's most neglected diseases. *British Medical Journal*, 325: 176-177.

Yang, Z., Mosser, D. M., & Zhang, X. (2009). Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* Infection of Macrophages. *The Journal of Immunology*, 178: 1077-1085.

Yao, C., Donelson, J. E., & Wilson, M. E. (2003). The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania sp.* Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 132: 1-16.