



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Investigação sobre uma atividade potenciadora da infecção murina por *Leishmania braziliensis* exercida por moléculas parasitárias hidrossolúveis

CINTIA FIGUEIREDO DE ARAÚJO

Salvador - Brasil

2013

CINTIA FIGUEIREDO DE ARAÚJO

Investigação sobre uma atividade potenciadora da infecção murina por *Leishmania braziliensis* exercida por moléculas parasitárias hidrossolúveis

Orientador: Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho

Co-orientadora: Dr^a. Virgínia Maria Góes da Silva

Dissertação apresentada ao curso de pósgraduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz FIOCRUZ / BA, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Salvador - Basil

2013

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Araújo, Cíntia Figueiredo de

A658i Investigação sobre uma atividade potenciadora da infecção murina por leishmania
braziliensis exercida por moléculas parasitárias hidrossolúveis . [manuscrito] / Cíntia
Figueiredo de Araújo . - 2013.

95 f.; 30 cm

Datilografado (fotocópia).

**Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz. Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa, 2013.**

Orientador: Drº. Lain Carlos Pontes de Carvalho

Co-orientadora: Drª Virgínia Maria Góes da Silva

1. Leishmania 2. Proteína. 3. Imunomodulação I. Título.

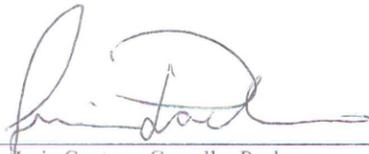
CDU 616.993.161:577.112

“INVESTIGAÇÃO SOBRE UMA ATIVIDADE POTENCIADORA DA INFECÇÃO MURINA POR
Leishmania brasiliensis EXERCIDA POR MOLÉCULAS PARASITÁRIAS HIDROSSOLÚVEIS”

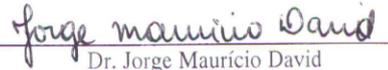
CÍNTIA FIGUEIREDO DE ARAÚJO

FOLHA DE APROVAÇÃO

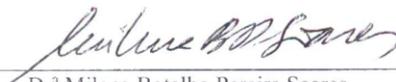
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Luis Gustavo Carvalho Pacheco
Professor Adjunto
UFBA



Dr. Jorge Mauricio David
Professor Associado
UFBA



Dr^a Milena Botelho Pereira Soares
Pesquisador Titular
CPqGM/FIOGRUZ

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a vida.

A meus pais, Maria Solange e José Carlos, e a meu irmão Ricardo, pelo amor, dedicação, por me ensinarem os melhores valores e por todo apoio nessa jornada acadêmica.

Ao Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho e à Dr^a. Virgínia Góes da Silva, pela orientação e por não terem medido esforços para me auxiliar em momentos de dúvidas, pela compreensão, pelo exemplo profissional e por todas as oportunidades de aprendizado.

À Dr^a. Fabíola Cardillo, que além disponibilizar reagentes para o andamento do experimento, esteve sempre à disposição para tirar qualquer dúvida.

À Dr^a Júlia da Cunha e ao Dr. Fabrício Marchini, pela grande ajuda nas análises de espectrometria de massas.

A Luciana, Viviane, André, Andréa, Ayling, Priscila, Fábio, Luecya, Mayara, Naiara, Candace, Felipe e toda a B05, e a Carlos Eduardo e Isaac, pela grande ajuda na realização dos experimentos, pois sem essa ajuda não conseguiria fazer todas as análises necessárias. Além disso, gostaria de agradecê-los pelo acolhimento e o maravilhoso convívio durante todo esse tempo.

A todos os demais amigos do LPBI que estiveram presentes nessa jornada.

A todos os professores que contribuíram para minha formação.

"Se não houver frutos, valeu a beleza das flores. Se não houver flores, valeu a sombra das folhas. Se não houver folhas, valeu a intenção das sementes."

Henfil , humorista e cartunista brasileiro.

RESUMO

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares que causam um conjunto de doenças, as leishmanioses, em milhões de pessoas no mundo. As leishmanias secretam moléculas que modulam o sistema imune do hospedeiro, contribuindo para o estabelecimento da infecção por interferirem na atividade microbicida do macrófago. Os objetivos desse trabalho foram identificar proteínas de *Leishmania* com atividade imunomoduladora e caracterizar essa imunomodulação. No trabalho foram avaliados os efeitos potenciadores de polipeptídeos da cinesina recombinante de *Leishmania infantum*, do extrato de *Leishmania braziliensis* (ELb) e de frações purificadas do extrato de *Leishmania amazonensis* (ELa), tratados ou não com inibidores de serina ou cisteína proteases, sobre a infecção por *L. braziliensis*, em camundongos BALB/c. Os animais foram acompanhados semanalmente, durante 6 semanas pós infecção, para a mensuração dos tamanhos das lesões. Após a eutanásia foi realizada a diluição limitante das lesões, a quantificação das concentrações de IL-4 e IL-10 da cultura em leucócitos estimulados com anti-CD3 e a semiquantificação de IgG1 e IgG2a do soro. Frações do ELa foram processadas por técnicas de espectrometria de massas para identificação de proteínas. Foi observado que frações de pesos moleculares aparentes de 28, 36, 45, 68 kDa do ELa foram capazes de potencializar a infecção por *L. braziliensis*, assim como um polipeptídeo da cinesina recombinante de *L. infantum* com motivos repetitivos e ELb contendo 5 µg de proteína. Quando as frações de 28 e 68 kDa foram tratadas com os inibidores de serina proteases, elas perderam a capacidade de potencializar a infecção por *L. braziliensis*, apesar de não terem sido identificadas serina proteases nessas frações por espectrometria de massas.

Palavras chaves: *Leishmania*, proteína, imunomodulação.

ABSTRACT

Leishmania are intracellular parasites that cause a group of diseases, the leishmaniases. Millions of people worldwide are infected with those protozoa. They secrete molecules that modulate the host immune system, allowing the establishment of the infection by interfering in the microbicidal activity of macrophages. The aims of this study were to identify proteins of *Leishmania* with immunomodulatory activity and characterize this immunomodulation. In this study the infection-enhancing effects of recombinant kinesin polypeptides of *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* extract (*LbE*) and purified fractions of the *Leishmania amazonensis* extract (*LaE*), treated or not with inhibitors of serine or cysteine proteases, on BALB/c mice infected with *L. braziliensis*. Animals were monitored weekly for 6 weeks post-infection for measuring the size of the lesion and after euthanasia were carried out at limiting dilution of the lesion, dose of IL-4 and IL-10 from culture supernatant of cells in draining lymph nodes lesion and determination of IgG1 and IgG2a serum. Fractions were processed by techniques of mass spectrometry for protein identification. It was seen that fractions of *LaE* with apparent molecular weights of 28, 36, 45, and 68 kDa were able to exacerbate the cutaneous disease caused by *L. braziliensis*, as were a recombinant kinesin polypeptide of *L. infantum* with repetitive motifs and *LbE* at a dose of 5 µg. However, when the fractions of 28 and 68 kDa were treated with inhibitors of serine proteases, they lost their ability to potentiate the infection by *L. braziliensis*, despite the fact that peptides of serine proteases were not identified in those fractions by mass spectrometry.

Keywords: *Leishmania* protein, immunomodulation.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP: adenosina trifosfato

cm: centímetro

CO₂: dióxido de carbono

C / motivos: polipeptídeos recombinates de cinesina de *Leishmania infantum* com motivos repetitivos

DNA: ácido desoxirribonucleico

EGPA: eletroforese em gel de poliacrilamida

EGPA-DSS: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

ELa: Extrato de amastigota *Leishmania amazonensis*

ELb: Extrato de amastigota *Leishmania braziliensis*

FRE: fração restante do extrato de amastigota *Leishmania amazonensis*

GP63: Glicoproteína de 63 kDa

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

H₂SO₄: ácido sulfúrico

HSP70: proteína de choque térmico 70

HSP83: proteína de choque térmico 83

H2A: histona humana 2A

H2B: histona humana 2B

H3: histona 3

H4: histona 4

IL-2: interleucina 2

IL-4: interleucina 4

IL-6: interleucina 6

IL-8: interleucina 8

IL-10: interleucina 10

IL-12: interleucina 12

IL-17: interleucina 17

IL-18: interleucina 18

IFN- γ : interferon gama

ini. Serina protease: inibidores de serina proteases

Ini. Cisteína protease: inibidores de cisteína proteases

KMP-11: proteína de membrana de cinotoplastídeo 11

kDa: kilodaltons

K9: cinesina 9

K26: cinesina 26

LACK: homólogo de leishmania de receptor de quinase C ativada

LTA: Leishmaniose tegumentar americana

LVA: Leishmaniose visceral americana

LeLf-2: fator-2 de alongamento

mg: microgramas

μ g: microgramas

mL: mililitros

μ L: microlitros

M: molar

mM: milimolar

μ M: micromolar

nm: nanômetro

NS: diferença não significante

NO: óxido nítrico

PRF: proteína de haster paraflagelar

PRF1: proteína de haster paraflagelar 1

PRF2: proteína de haster paraflagelar 2

PBS: tampão fosfato-salino

PBS-T: tampão fosfato-salino e tween-20

PDI: proteína dissulfeto isomerase

pg: picograma

rpm: rotações por minuto

S / motivos: polipeptídeos recombinates de cinesina de *Leishmania infantum* sem motivos repetitivos

Th1: Células T auxiliares do tipo 1

Th2: Células T auxiliares do tipo 2

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TGF- β : fator de crescimento tumoral beta

TLCK: hidrocloreto de N-Tosil-L lisina clorometil cetona

TPCK: hidrocloreto de N-p-tosil-L fenilalanina clometil cetona

° C: grau Celsius

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Ciclo de transmissão da <i>Leishmania</i>.....	18
FIGURA 2. Polipeptídeos de cinesina recombinante.....	28
FIGURA 3. Gel de poliacrilamida das frações do <i>ELa</i>.....	35
FIGURA 4. Tamanho da lesão do primeiro experimento das frações do <i>ELa</i>.....	36
FIGURA 5. Carga parasitária do primeiro experimento das frações do <i>ELa</i>.....	37
FIGURA 6. Produção de IL-4 do primeiro experimento das frações do <i>ELa</i>.....	37
FIGURA 7. Correlação entre a produção de IL-4 e tamanho da lesão do primeiro experimento das frações do <i>ELa</i>.....	38
FIGURA 8. Correlação entre a produção de IL-4 e a carga parasitária do primeiro experimento das frações do <i>ELa</i>.....	38
FIGURA 9. Tamanho da lesão segundo experimento das frações do <i>ELa</i>.....	39
FIGURA 10. Carga parasitária do segundo experimento das frações do <i>ELa</i>....	40
FIGURA 11. Produção de IL-4 do segundo experimento das frações do <i>ELa</i>....	41
FIGURA 12. Correlação entre o tamanho da lesão e produção de IL-4 do segundo experimento das frações do <i>ELa</i>.....	42
FIGURA 13. Correlação entre a carga parasitária e produção de IL-4 do segundo experimento das frações do <i>ELa</i>.....	42
FIGURA 14. Produção de IL-4 do segundo experimento das frações de <i>ELa</i>....	43
FIGURA 15. Correlação entre o tamanho da lesão e produção de IL-10 do segundo experimento das frações do <i>ELa</i>.....	44
FIGURA 16. Correlação entre a carga parasitária e produção de IL-10 do segundo experimento das frações do <i>ELa</i>.....	44
FIGURA 17. Semiquantificação de IgG1 do experimento das frações do <i>ELa</i>...45	45
FIGURA 18. Semiquantificação de IgG1 do experimento das frações do <i>ELa</i>...45	45
FIGURA 19. Corelação entre a quantificação de IgG1 e produção de IL-4 do experimento das frações do <i>ELa</i>.....	46
FIGURA 20. Tamanho da lesão do experimento com polipeptídeos da cinesina recombinantes.....	47
FIGURA 21. Carga parasitária do experimento com polipeptídeos da cinesina recombinantes.	47

FIGURA 22. Produção de IL-4 do experimento com polipeptídeos da cinesina recombinantes.....	48
FIGURA 23. Tamanho da lesão do experimento com <i>ELb</i>.....	49
FIGURA 24. Carga parasitária do experimento com <i>ELb</i>.....	50
FIGURA 25. Tamanho da lesão do <i>ELa</i> tratados com inibidores de serina ou cisteína proteases.....	51
FIGURA 26. Tamanho da lesão da fração de 28 kDa tratados com inibidores de serina ou cisteína proteases.....	52
FIGURA 27. Tamanho da lesão da fração de 68 kDa tratados com inibidores de serina ou cisteína proteases.....	53
FIGURA 28. Carga parasitária do <i>ELa</i> tratados com inibidores de serina ou cisteína proteases.....	54
FIGURA 29. Carga parasitária da fração 28 kDa tratados com inibidores de serina ou cisteína proteases.....	54
FIGURA 30. Carga parasitária da fração 68 kDa tratados com inibidores de serina ou cisteína proteases.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Fração de 28 kDa.....	56
TABELA 2. Fração de 36 kDa.....	57
TABELA 3. Frações de 45 kDa.....	58
TABELA 4. Frações de 68 kDa.....	58

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	17
2.REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1. <i>Leishmania</i>	18
2.2. Ciclo biológico e transmissão da <i>Leishmania</i>	18
2.3. Leishmanioses humanas.....	20
2.4. Modelos experimentais murinos de leishmaniose.....	21
2.4.1. Modelos experimentais murinos de leishmaniose cutânea.....	21
2.4.2. Modelos experimentais em leishmaniose visceral.....	22
2.5. Proteínas de <i>Leishmania</i> com atividade biológica sobre o hospedeiro e/ou imunogenicidade descritas	22
2.5.1. Proteína de membrana de cinetoplastídeo 11 (KMP-11)	22
2.5.2. Homólogo de <i>Leishmania</i> de receptor de quinase C ativada (LACK)	23
2.5.3. Cisteína protease	23
2.5.4. Serina proteases	23
2.5.5. Proteína de choque térmico 70 (HSP70).....	24
2.5.6. Histonas.....	24
2.5.7. Proteínas de haste paraflagelar (PRF).....	24
2.5.8. Gp63.....	25
3.HIPÓTESES DE TRABALHO	26
4.OBJETIVOS	27
Objetivo geral	27
Objetivos específicos	27
5.JUSTIFICATIVA	28
6. METODOLOGIA	29
6.1. Parasitos, extratos e polipeptídeos recombinantes	29
6.2. Obtenção de frações	30
6.3. Avaliação do efeito sobre a infecção e o sistema imune de moléculas de <i>Leishmania</i>	31
6.3.1. Injeção das frações do ELa e de cinesinas recombinantes.....	31
6.3.2. Injeção de extrato de <i>L. braziliensis</i> (ELb).....	31
6.3.3. Injeção de frações do ELa tratadas com inibidores de serina ou cisteína protease.....	32
6.3.4. Infecção e acompanhamento do tamanho da lesão.....	32

6.3.5. Mensuração da carga parasitária.....	32
6.3.6. Dosagem de citocinas	33
6.3.7. Dosagem de IgG1.....	33
6.4. Espectrometria de massas	34
6.5. Análises estatísticas	35
7.RESULTADOS	36
7.1. Purificação das frações	36
7.2. Efeito potenciador da infecção das frações do <i>ELa</i>	36
7.2.1. Primeiro experimento	36
7.2.1. Segundo experimento	39
7.3. Efeito potenciador da infecção de polipeptídeos recombinantes de <i>L. infantum</i> com e sem motivos repetitivos	47
7.4. Efeito promotor da infecção do extrato de <i>Leishmania braziliensis</i> (<i>ELb</i>)	49
7.5. Efeito promotor da infecção de frações do <i>ELa</i> tratadas com inibidores de serina ou cisteína protease	51
7.6. Espectrometria de massas de frações de extrato de <i>L. amazonensis</i>	56
8.DISSCUSSÃO	60
9.CONCLUSÕES.....	70
10.PERSPECTIVAS.....	71
REFERÊNCIA	72

1.INTRODUÇÃO

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares que causam um conjunto de doenças, as leishmanioses, em milhões de pessoas no mundo. A forma que a leishmaniose se apresenta está relacionada à espécie do parasito, podendo ser cutânea, mucocutânea e visceral (MALAFAY, 2008).

A transformação da *Leishmania* em formas amastigotas no hospedeiro vertebrado é, dentre outros, um mecanismo de evasão ao sistema imune importante, pois a fagocitose das formas amastigotas desencadeia menor metabolismo oxidativo nos macrófagos quando comparadas às formas promastigotas (PEARSON et al., 1983). Os parasitos desse gênero secretam moléculas que modulam o sistema imune do hospedeiro, contribuindo para o estabelecimento da infecção por interferirem na atividade microbida do macrófago (TABATABAEE et al., 2011).

A identificação e caracterização funcional de moléculas do protozoário podem esclarecer a patogênese da leishmaniose e contribuir para o desenvolvimento de métodos terapêuticos e profiláticos.

Em trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa, observou-se que aplicações quinzenais de um extrato aquoso de amastigotas de *Leishmania amazonensis*, por via intravenosa (SILVA et al., 2011), ou mesmo uma única injeção por via intradérmica (dados não publicados), potencializam a infecção por *Leishmania braziliensis* em camundongos BALB/ c, que são normalmente resistentes a esse tipo de parasita. Esta potenciação da infecção foi inibida quando o extrato era misturado com inibidores de serina protease antes da injeção (SILVA et al., 2011). A aplicação pela via intravenosa do extrato de amastigota de *L. braziliensis*, no entanto, não teve o mesmo efeito (SILVA et al., 2011). Moléculas com pesos moleculares estimados de 96 kDa, 52 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 19 kDa e 15 kDa foram visualizadas em frações do extrato de *L. amazonensis* que, assim como o extrato total, agravaram significativamente a doença causada por *L. braziliensis* (dados não publicados). Dessa forma, uma ou mais moléculas, com algum ou alguns desses pesos moleculares, pode(m) ser responsável(is) pela atividade observada.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Leishmania*

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam duas formas durante o seu ciclo evolutivo, as amastigotas, que não possuem flagelo livre e são parasitos intracelulares obrigatórios, preferencialmente de células do sistema fagocítico-mononuclear de hospedeiros vertebrados, onde se dividem por divisão binária simples, e as formas flageladas promastigotas, que são encontradas no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados (SILVA - LÓPEZ, 2010).

As espécies de *Leishmania* diferem nos padrões de desenvolvimento nos hospedeiros invertebrados naturais, sendo por isso divididas em dois grupos: o subgênero *Viannia* e o subgênero *Leishmania* (LAINSON, 1983). As principais espécies do subgênero *Viannia* são as *L. braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania peruviana*, *Leishmania naiffi*, *Leishmania lainsoni*, *Leishmania shawi*, *Leishmania colombiensis* e *L. equatorensis*. Já as espécies do subgênero *Leishmania* são as *L. amazonensis*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania venezuelensis*, *Leishmania pifanoi*, *Leishmania hertigi*, *Leishmania enriettii*, *Leishmania deanei*, *Leishmania aristidei*, *Leishmania garnhami*, *Leishmania forattinii*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania infantum*, *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica*, *Leishmania arabica* e *Leishmania turanica* (LAINSON, 1983).

2.2. Ciclo biológico e transmissão da *Leishmania*

O ciclo biológico e a transmissão da *Leishmania* ocorrem basicamente entre flebotomíneos fêmeas, que são hematófagos, e os hospedeiros vertebrados. Após o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, as formas amastigotas se transformam em promastigotas, dentro do flebotomíneo, migrando para as partes anteriores do tubo digestivo, atingindo o aparelho picador sugador. Ao picar outro hospedeiro vertebrado, ocorre a inoculação das formas promastigotas, que são fagocitadas por macrófagos onde os parasitos se transformam em formas amastigotas, que se multiplicam dentro dos vacúolos parasitóforos. A célula

infectada multiplica-se, dividindo seus parasitos entre as células filhas ou se rompe liberando os amastigotas que são, então, fagocitados por outros macrófagos. Em outros repastos sanguíneos, novos flebotomíneos ingerem macrófagos infectados, recomeçando o ciclo (Figura1) (LAINSON, 1987).

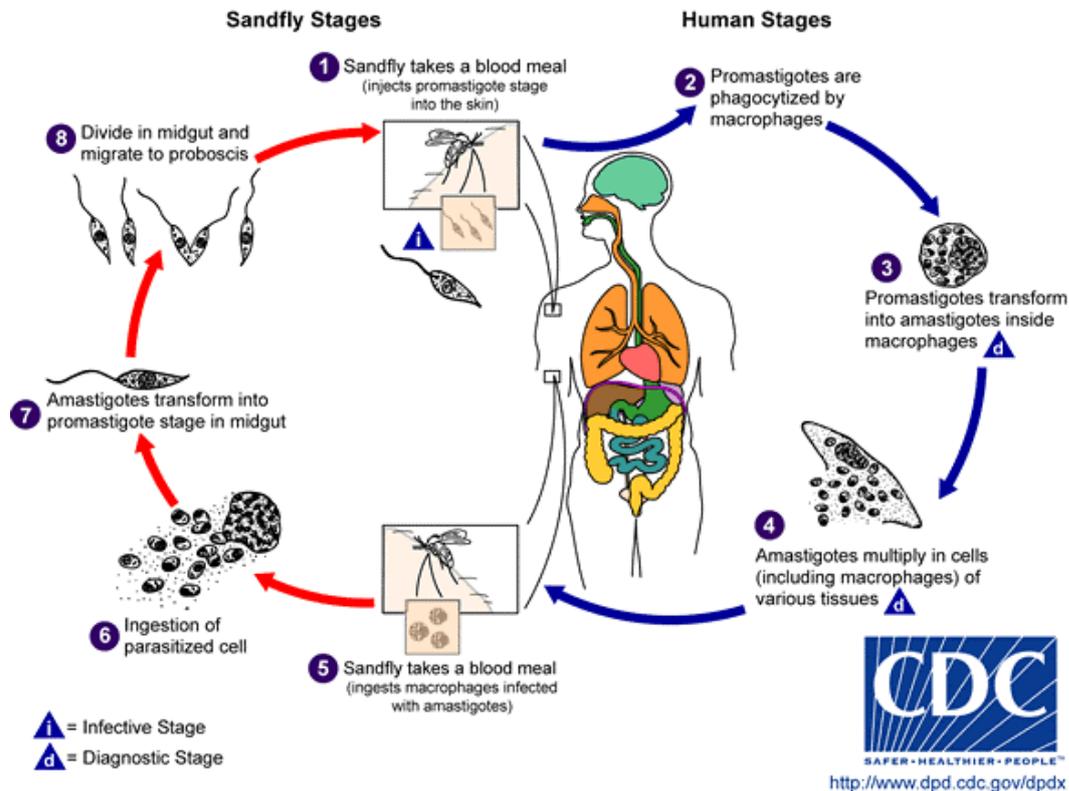


Figura 1. Ciclo de transmissão da *Leishmania*

- 1) Repasto sanguíneo e inoculação de promastigotas
- 2) Promastigotas são fagocitados por macrófagos
- 3) As promastigotas se transformam em amastigotas dentro do macrófago
- 4) Multiplicação intracelular das formas amastigotas
- 5) Repasto sanguíneo pelo flebotomíneo
- 6) Ingestão das células parasitadas
- 7) Transformação de amastigota em promastigota no estômago do inseto
- 8) Divisão das formas promastigotas no estômago do inseto

2.3. Leishmanioses humanas

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma das doenças endêmicas de maior importância em saúde pública no Brasil, pois há uma alta distribuição pelo território nacional e há a ocorrência de formas clínicas graves (DORVAL et al., 2006). Ela apresenta um caráter antroponóptico, sendo causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, sendo que, no Brasil, as *L. braziliensis* e *L. amazonensis* são as espécies mais amplamente distribuídas (DORVAL et al., 2006). A LTA apresenta-se clinicamente sob quatro formas distintas da doença: leishmaniose cutânea localizada (causada no Brasil principalmente pelas *L. braziliensis* e *L. amazonensis*), leishmaniose mucosa (causada no Brasil pela *L. braziliensis*), leishmaniose cutânea disseminada (causada no Brasil pelas *L. braziliensis* e *L. guyanensis*) e a leishmaniose difusa (causada pela *L. amazonensis*) (CARVALHO, PASSOS e JESUS, 2005; DELGADO et al., 1997).

A leishmaniose é uma doença predominantemente de área rural, porém, recentemente têm aparecido casos de leishmaniose visceral americana (LVA) em áreas urbanas ou periurbanas, onde o vetor está encontrando condições ambientais propícias para a manutenção do seu ciclo de vida, constituindo um processo de urbanização da LVA no Brasil, principalmente em cidades de médio e grande porte do Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, tais como: São Luís (MA), Teresina (PI), Fortaleza (CE), Natal (RN), Rio de Janeiro (RJ), e Belo Horizonte (MG) (CALDAS et al., 2011).

Em seres humanos, o controle da infecção contra a *Leishmania* é mediado por células (CARVALHO, PASSOS e JESUS, 2005). Nas leishmanioses cutânea e mucocutânea, existe uma forte resposta Th1 que controla a multiplicação do parasita, porém leva a lesão tecidual, enquanto que na leishmaniose cutânea disseminada e na leishmaniose cutânea difusa, há diminuição ou ausência de resposta Th1 e persistência do parasito (CARVALHO, PASSOS e JESUS, 2005). A leishmaniose visceral é causada por *L. infantum* (no Velho e Novo Mundo) ou *L. donovani*, (no Velho Mundo), as quais infectam macrófagos no baço, fígado e também medula óssea, (revisado por POCAI et al., 1998). No Novo Mundo, os pacientes podem apresentar concentrações séricas elevadas de IL-10, a qual inibe a ativação de macrófagos que favorece a persistência do parasito e causa imunossupressão nos indivíduos doentes (MAGALHÃES et al., 2006). Também há

elevação das concentrações séricas de IL-8, INF- γ , TNF- α e IL-6, as quais estão envolvidas na mudança do status clínico na leishmaniose visceral ativa (MAGALHÃES et al., 2006).

2.4. Modelos experimentais murinos de leishmaniose

2.4.1. Modelos experimentais murinos de leishmaniose cutânea

Em modelos experimentais murinos de leishmaniose cutânea, uma resposta Th1 associada à produção de IL-2, INF- γ e TNF- α , observada em camundongos C57Bl/6 infectados com *L. major*, está ligada à resistência ao patógeno e à cura espontânea da lesão (SCOTT et al., 1988; SCOTT et al., 1989). As linhagens C3H/HeJ e CBA são também capazes de controlar a infecção por *L. major* (FONSECA et al., 2003) por elevação da produção de IL-18, IL-12 e INF- γ .

Por outro lado, a resposta Th2, caracterizada pela produção de IL-4 e IL-5, observada em camundongos BALB/c infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*, está associada à susceptibilidade à infecção e à proliferação do parasito (SCOTT et al., 1988; SCOTT et al., 1989; MATTHEWS et al., 2000). A IL-4 e o TGF- β inibem a ativação dos macrófagos pelo INF- γ (GUMY, LOUIS e LAUNOIS, 2004). Quando camundongos BALB/c são infectados por *L. major* pela via subcutânea, eles desenvolvem uma lesão progressiva, necrótica e visceralizante, que leva ao óbito, (SCOTT e FARREL, 1982; SCOTT E SCHARTON, 1994; FONSECA et al., 2003). Entretanto, esse modelo de infecção subcutânea não reproduz determinados aspectos da biologia natural da transmissão, como a inoculação de baixas doses de parasitos (SCOTT e FARREL, 1982). Alguns trabalhos caracterizaram a infecção por *L. braziliensis* em modelos murinos. Com isso, foi observado que camundongos BALB/c são mais susceptíveis à infecção por *L. braziliensis* que outras linhagens de camundongos, porém não desenvolvem lesões graves e os animais são capazes de curar-se da infecção por meio de uma resposta celular mista, na qual é observada presença de IL-4, INF- γ e IL-10 (TAVARES et al., 2009). O grau de suscetibilidade à infecção depende, portanto tanto da espécie de *Leishmania* quanto do arcabouço genético do camundongo. Dessa forma, como mencionado acima, camundongos BALB/c são parcialmente resistentes à *L. braziliensis* (TAVARES et al., 2009) e susceptíveis à *L. amazonensis* (SCOTT et al., 1988; SCOTT et al.; 1989) e à *L.*

major (SCOTT e FARREL, 1982), enquanto camundongos CBA e C57Bl/6 são resistentes à *L. braziliensis* (CHILDS et al., 1984) e à *L. major* (DEKREY et al., 1998; HOWARD et al., 1980; ROGERS et al., 2002) e susceptíveis à *L. amazonensis* (AFONSO e SCOTT, 1993).

2.4.2. Modelos experimentais de leishmaniose visceral

O modelo experimental relatado como ideal para o estudo em leishmaniose visceral é o que utiliza o hamster, pois a infecção por *L. donovani* ou *L. chagasi* nesse modelo animal, promove hepatomegalia, esplenomegalia e hipoalbuminemia, características estas que são observadas em pacientes com infecções graves (TAVARES et al., 2009). Os modelos murinos, no entanto, não são ideais para estudar infecção visceral, pois mesmo as linhagens susceptíveis são capazes de controlar a infecção por *L. donovani* e *L. chagasi* (MURRAY et al., 1987).

2.5. Proteínas de *Leishmania* com atividade biológica sobre o hospedeiro e/ou imunogenicidade descritas

2.5.1. Proteína de membrana de cinetoplastídeo 11 (KMP-11)

A KMP-11, com peso molecular de 11 kDa está associada ao lipofosfoglicano nos amastigotas de *Leishmania* e diminui a produção de óxido nítrico, favorecendo a sobrevivência do protozoário no interior dos macrófagos (MATOS et al., 2010).

Essa molécula está presente em todos os protozoários cinetoplastídeos e induz a produção de IL-10 em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea (LACERDA et al., 2012). Ela também inibe a produção de IFN- γ em células estimuladas com antígenos solúveis de *Leishmania* (LACERDA et al., 2012). É sugerido que a KMP-11 desempenha papel na infectividade de promastigotas, pois a expressão dela é diminuída quando há perda de virulência por repetições de subculturas *in vitro* (LACERDA et al., 2012).

A KMP-11 é uma molécula altamente antigênica para cães e camundongos e reage com células T de seres humanos, sendo assim possui potencial como antígeno para novas vacinas (AGALLOU, MARGARONI e KARAGOUNI, 2011). Além disso, sua expressão é maior nas formas amastigotas, indicando assim um papel na relação parasito com o hospedeiro mamífero (AGALLOU, MARGARONI e KARAGOUNI, 2011). Lacerda e colaboradores (2012) observaram que a KMP-11

exarcebou a infecção por *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, resultando em aumento da concentração de IL-10 e da atividade da arginase assim, como redução da produção de óxido nítrico, também houve correlação positiva estatisticamente significativa entre as concentrações de IL-10 e carga parasitária intracelular.

2.5.2. Homólogo de *Leishmania* de receptor de quinase C ativada (LACK)

O LACK é uma proteína altamente conservada entre espécies de *Leishmania* de 36 kDa. Embora a sua função não seja clara, foi demonstrado que ele é crucial para a viabilidade do parasita e para a infecção (HUGENTOBLE et al., 2012). É sugerido que o LACK desempenha um papel na replicação do DNA e síntese do RNA (HUGENTOBLE et al., 2012). A indução de tolerância imunológica ao LACK diminui a infecção leishmaniótica em camundongos, indicando que uma resposta imunológica contra ele aumenta a susceptibilidade à doença (LANGE et al., 2004).

2.5.3. Cisteína proteases

Segundo Guedes e colaboradores (2010), a cisteína protease é um importante fator de virulência para a invasão do parasito no hospedeiro e na patogenia da leishmaniose. Embora as funções da cisteína protease ainda não tenham sido completamente elucidadas, sabe-se que essa molécula é importante para a sobrevivência das formas promastigotas e amastigotas (SAFFARI e MOHABATKAR, 2009). A *Leishmania* não sobrevive no interior do macrófago na presença de inibidor de cisteína protease (MOTTRAM, 1996).

2.5.4. Serina proteases

Essas moléculas estão entre as enzimas mais estudadas e participam de um vasto número de processos fisiológicos e patológicos em diferentes sistemas (HUGENTOBLE et al., 2012). A importância das serina proteases tornou-se evidente na atividade parasitária de *Plasmodium* e *Trypanosoma* (CHOUDHURY et al., 2009). Suas caracterizações bioquímicas são de interesse não só para compreensão da bioquímica destas enzimas, mas também para entender seus possíveis papéis na infecção parasitária. Essas moléculas já foram identificadas em *L. amazonensis* e em *L. donovani* (CHOUDHURY et al., 2009).

As serina proteases possuem uma forte atividade hidrolítica contra vários componentes da matriz extracelular e proteínas do plasma humano, por isso elas

possuem um papel vital no processo de invasão dos tecidos do hospedeiro (CHOUDHURY et al., 2010). Elas estão assim envolvidas na invasão de célula do hospedeiro, pela promoção da migração do parasito através de barreiras teciduais, assim como na degradação de proteínas do hospedeiro para a nutrição, evasão da resposta imune e ativação da inflamação (LÓPEZ et al., 2010). Inibidores de serina protease, como mencionado na Introdução, inibem a atividade potenciadora da infecção de injeções intravenosas de extrato de *L. amazonensis* (SILVA et al., 2011).

2.5.5. Proteína de choque térmico 70 (HSP70)

As HSP70 constituem um grupo de proteínas evolutivamente conservadas, sendo relatadas como antígenos em doenças bacterianas, protozários, fungos e nematoides (DORES-SILVA et al., 2012). Elas são chaperonas, e compreendem uma família de proteínas presentes em todos os compartimentos celulares de eucariotos (DORES-SILVA et al., 2012) uma função essencial no metabolismo de proteínas e atuam regulando o seu ciclo de ação, como ligação de ATP, e hidrólise e liberação de ADP (DORES-SILVA et al., 2012). As proteínas da família HSP70 são portanto componentes de muitos processos celulares fundamentais, incluindo a dobragem e montagem de proteínas recém sintetizadas, a secreção de proteínas, a degradação proteolítica de proteínas instáveis e o controle de proteínas com atividade reguladora (RAMÍREZ, REQUENA e PUERTA, 2011). A HSP70 de *L. braziliensis* induz a produção de IL-2 e IFN- γ , presentes em uma resposta Th1, quando administrada a camundongos (CARRILLO et al., 2008).

2.5.6. Histonas

As histonas nucleossomais da *Leishmania* parecem estar envolvidas nos mecanismos patológicos de leishmaniose (CARRIÓN, 2011). Apesar de as histonas serem proteínas altamente conservadas entre eucariotos, tem sido relatado que os domínios N-terminais das histonas de *Leishmania* podem encontrar-se modificados, possivelmente constituindo um mecanismo de virulência do parasito (CARRIÓN, 2011).

2.5.7. Proteínas de haste paraflagelar (PRF)

Hastes paraflagelares foram descritas em parasitas cinetoplastídeos (revisto por SANTRICH et al., 1997). Suas principais proteínas foram avaliadas em *Crithidia fasciculata* (76 kDa e 68 kDa), *Trypanosoma brucei* (75 kDa a 72 kDa),

Trypanosoma cruzi (70 kDa e 68 kDa), *L. amazonensis* (74 kDa e 69 kDa), e *Euglena gracilis* (80 kDa e 69 kDa), sendo que a abundância relativa destas proteínas na haste paraflagelar mostram que elas são suas principais constituintes (revisto por SANTRICH et al., 1997). Estas proteínas em *T. cruzi*, *T. brucei* e espécies de *Leishmania* foram identificadas em duas principais bandas por eletroforese com massas moleculares variando de 70 – 80 kDa para 68 -70 kDa, as quais foram designadas como PFR1 e PFR2, respectivamente (ABDILLE et al., 2008). Essas proteínas são organizadas tridimensionalmente em estruturas que são responsáveis pela motilidade do parasito (ABDILLE et al., 2008). A PRF-2 é um imunógeno conservado entre as espécies de *Leishmania* (CARRILLO et al., 2008).

2.5.8. Gp63

É uma glicoproteína (63 a 68 kDa) ligada a glicosilfosfatidilinositol. Está presente nas formas promastigostas e amastigotas de *Leishmania* (McDONALD et al., 1995). A gp63 é capaz de degradar muitos substratos, como caseína, gelatina, albumina, hemoglobina e fibrinogênio (YAO et al., 2003). Ela também tem a capacidade de degradar enzimas lisossomais, possibilitando a sobrevivência da *Leishmania* dentro das células fagocitárias (CHANG e McGWIRE, 2002).

A gp63 foi um dos primeiros antígenos definidos e testados como vacina contra *Leishmania*, tendo sido utilizada para imunizar camundongos e induzir uma proteção parcial contra uma infecção por *L. mexicana* (RUSSEL e ALEXANDER, 1988).

3.HIPÓTESES DE TRABALHO

Molécula(s) de 15 kDa, 19 kDa, 28 kDa, 36 kDa, 45 kDa, 54 kDa e 68kDa, presente(s) em extrato de amastigotas de *L. amazonensis*, potencia(m), quando injetada(s) intravenosamente, a infecção leishmaniótica (de forma dependente tanto de IL-4 quanto de atividade de serina protease). Uma das hipóteses de trabalho da pesquisa descrita nesta dissertação é que uma ou mais moléculas de *L. amazonensis*, com algum dos pesos moleculares citados acima, um polipetídeo correspondente a parte da cinesina recombinante de amastigota de *L. infantum*, potenciam a infecção quando injetadas, em quantidades relativamente pequenas, intradermicamente (de maneira similar ao que acontece quando injetadas em maiores quantidades intravenosamente). Outras hipóteses são que um extrato de *L. braziliensis* não teria atividade potenciadora da infecção e que seria evidenciada atividade potenciadora da infecção em proteína(s) de *L. amazonensis* para a(s) qual (is) ainda não teria sido creditada tal atividade.

4.OBJETIVOS

Objetivo geral

Identificar proteínas de *Leishmania* com atividade imunomoduladora e caracterizar essa imunomodulação.

Objetivos específicos

Determinar se a presença de atividade potenciadora da infecção em extrato de amastigotas, quando este é injetado intradermicamente, é específica para a espécie *L. amazonensis* em relação à espécie *L. braziliensis*.

Testar frações de extrato de amastigotas de *L. amazonensis*, obtidas por eletroforese seguida por eletroeluição, e um polipetídeo recombinante correspondente a parte da cinesina recombinante de amastigota de *L. infantum*, quanto à capacidade de modificar a infecção e a resposta imunológica em camundongos infectados por *L. braziliensis*.

Determinar se alguma dessas frações tem sua atividade promotora da infecção reduzida por inibidores de serina proteases.

Identificar, por espectrometria de massas, proteínas nas frações que exercem atividade sobre a infecção quando injetadas intradermicamente.

5.JUSTIFICATIVA

A identificação de moléculas com atividade imunomoduladora pode ser importante para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos relacionados à prevenção da infecção, utilizando essas moléculas como componentes vacinais, associados a adjuvantes que promovam uma resposta imunológica que iniba a atividade imunomoduladora, e/ou para o tratamento das leishmanioses, como componentes de preparados imunoterapêuticos.

6. METODOLOGIA

6.1. Parasitos, extratos e polipeptídeos recombinantes

Amastigotas axênicos de *L. amazonensis* (cepa MHOM/BR88/BA/125) e *L. braziliensis* (cepa MHOM/Br/3456) foram obtidos segundo protocolos otimizados em nosso laboratório (TEIXEIRA et al., 2002). Extratos de *L. amazonensis* (ELa) e de *L. braziliensis* (ELb) foram preparados como descrito na literatura (SILVA et al., 2011). A quantificação de proteína nos extratos foi realizada pelo método de Lowry (1951). Um polipeptídeo recombinante correspondente a parte da cinesina recombinante de amastigota de *L. infantum* (PINHEIRO et al., 2011) foi preparado pelo Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira em nosso laboratório, e uma construção desse fragmento com e sem motivos repetitivos foi preparada por uma empresa comercial (Figura 2).

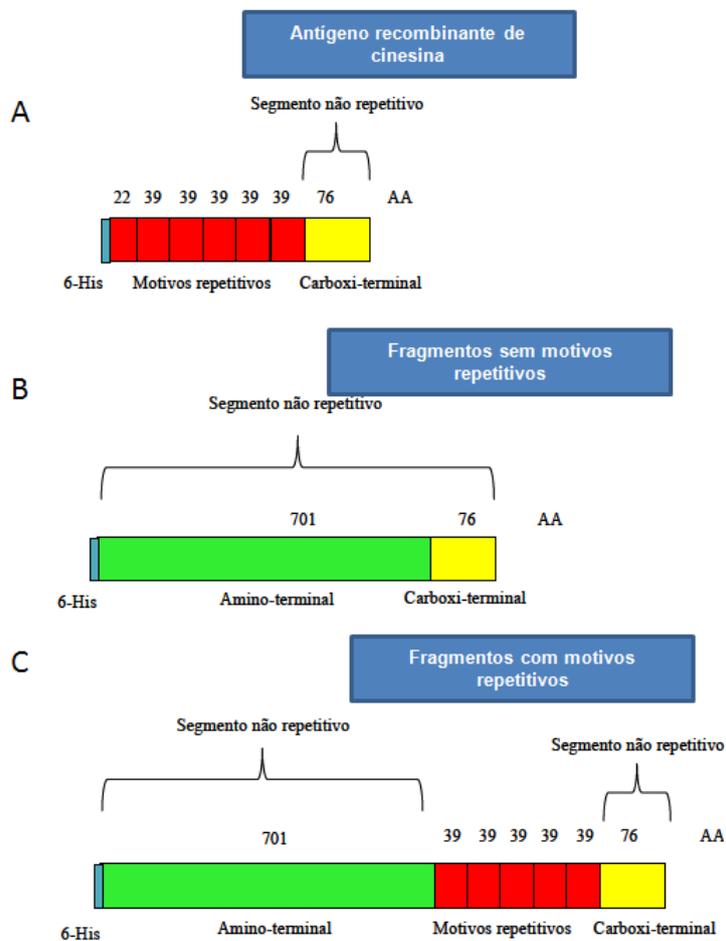


Figura 2. Polipeptídeos de cinesina recombinante. (A) Antígeno recombinante de uma cinesina de *Leishmania infantum*, caracterizado por possuir um segmento com 5,5 motivos repetitivos de 39 AA,

incluindo uma cauda de seis histidinas, e um segmento não repetitivo carboxil-terminal de 76 AA. (B) Fragmento sem motivos repetitivos de uma cinesina recombinante de *Leishmania infantum* possui um segmento não repetitivo da extremidade amino-terminal, 701 AA, incluindo uma cauda de seis histidinas, seguidos de um segmento não repetitivo carboxil-terminal de 76 AA. (C) Fragmento com motivos repetitivos de uma cinesina recombinante codificado de *Leishmania infantum* possui um segmento não repetitivo da extremidade amino-terminal, 701 AA, incluindo uma cauda de seis histidinas, seguidos de um segmento com 5,5 motivos repetitivos de 39 AA e um segmento não repetitivo de 76 AA.

6.2. Obtenção de frações

O ELa foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) a 12% (LAEMMLI et al., 1970) em condições não desnaturantes. O gel foi corado com azul de Coomassie para visualização das bandas. Fragmentos do gel com proteínas com pesos moleculares aparentes de 96 kDa, 68 kDa, 52 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 28 kDa, 19 kDa e 15 kDa, escolhidos a partir de resultados prévios, foram cortados isoladamente. O restante do gel foi agrupado para dar origem a uma outra fração denominada FRE (fração restante do ELa). O material foi colocado em membranas de diálise e eletroeluído como descrito na literatura (BHOWMICK e ALI, 2009). A efetividade da purificação foi determinada pela submissão das frações a EGPA na presença de dodecil sulfato de sódio (EGPA - DSS; LAEMMLI et al., 1970).

A quantificação de proteína foi feita por um método baseado na reação de proteínas com fluorescamina. Resumidamente, 10 µL da solução estoque de fluorescamina (Research Organics, Cleveland, EUA) a 1 mg/mL em acetona, mantida a 4^o C, foram adicionados a 50 µL das amostras diluídas em uma solução diluidora de bicarbonato de sódio a 0,1 M (pH 8,0) contendo 1% da solução de nonil fenol polietileno glicol (Nonited, solução substituta P 40; Sigma). Em poços de placas de 96 poços de fundo plano. Uma curva padrão foi preparada com volumes de 50 µL de diluições duplas de albumina sérica bovina (de 0,0078 a 0,5 mg/mL) na mesma solução diluidora. Logo após à adição da solução de fluorescamina aos poços contendo as diluições das amostras e da curva padrão, a intensidade da fluorescência nos poços foi lida em um fluorímetro, ajustado para radiações luminosas com comprimentos de onda de 390 nm (excitação) e 475 nm (emissão).

6.3. Avaliação do efeito sobre a infecção e o sistema imune de moléculas de *Leishmania*

6.3.1. Injeção das frações do ELa e de cinesinas recombinantes

Através da via intradérmica foram injetados em camundongos BALB/c com 50 µL de salina (controle negativo), com um volume de ELa contendo 5 µg de proteína (controle positivo), com volumes das frações do ELa contendo as quantidades de proteínas especificadas abaixo, ou com 5 µg de cinesina recombinante, com e sem domínios repetitivos, em 50 µL de salina, uma semana antes de serem infectados com *L. braziliensis*. Em trabalho anteriormente realizado em nosso laboratório foi demonstrado que a injeção de extrato contendo somente 1,25 µg de proteína potenciou a infecção (dados não publicados).

O valor da quantidade total de proteína eluída do gel e os valores das quantidades de proteína presentes em cada fração foram utilizados para determinar a porcentagem de cada fração que estaria presente no extrato não fracionado. As quantidades de proteína em cada fração foram as seguintes: 15 kDa, 9,7 µg; 19 kDa, 8,8 µg; 36 kDa, 7,3 µg; 28 kDa, 8,4 µg; 68 kDa, 4,0 µg; 54 kDa, 4,3 µg; 45 kDa, 3,7 µg e fração restante do ELa, FRE, 13,6 µg.

A quantidade de cada fração a ser injetada, quantidade esta correspondente à quantidade da fração contida em um volume do extrato não fracionado contendo 5 µg de proteína, foi determinada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Quantidade de proteína de cada fração a ser injetada (em microgramas)} = \frac{\text{Quantidade de proteína em cada fração}}{\text{Quantidade total de proteína eletroeluída do gel}} \times 5$$

6.3.2. Injeção de extrato de *L. braziliensis* (ELb)

Camundongos BALB/c foram injetados, por via intradérmica, com (1) 50 µL de salina (controle negativo), (2) volumes de ELa, contendo 5, 30 e 186 µg de proteína (controles positivos), ou (3) volumes de ELb contendo 5, 30 e 186 µg de proteína, em 50 µL de salina.

6.3.3. Injeção de frações do ELa tratadas com inibidores de serina ou cisteína protease

Camundongos BALB/c foram divididos em dez grupos e injetados, por via intradérmica, com (1) 50 µL de salina (controle negativo), (2) volume de ELa contendo 5 µg de proteína (controle positivo), (3) volume de ELa contendo 5 µg de proteína com inibidores de serina protease [5,4 mM hidrocloreto de N-tosyl-L-lisina clorometil cetona (TLCK) e 5,7 mM *N-p*-tosyl-L- fenilalanina clorometil cetona (TPCK)], (4) volume de ELa contendo 5 µg de proteína com inibidor de cisteína protease (5 mM iodoacetamida; Sigma Chemical Co.), (5) fração de 28 kDa (controle positivo), (6) fração 28 kDa com inibidores de serina protease (5,4 mM TLCK e 5,7 mM TPCK), (7) fração de 28 kDa com inibidor de cisteína protease (5 mM de iodoacetamida), (8) fração de 68 kDa (controle positivo), (9) fração de 68 kDa com inibidores de serina protease (5,4 mM TLCK e 5,7 mM TPCK) e (10) fração de 68 kDa com inibidor de cisteína protease (5 mM de iodoacetamida). As quantidades injetadas de proteína das frações foram calculadas como detalhado no item 6.3.1 acima.

6.3.4. Infecção e acompanhamento do tamanho da lesão

Uma semana após serem sensibilizados, os camundongos BALB/c foram inoculados no coxim da pata traseira direita com 10^7 promastigotas de *L. braziliensis*, em fase estacionária de cultivo, por via intradérmica. A evolução das lesões nos camundongos foi acompanhada através de medida semanal do tamanho da lesão com paquímetro digital, até a sexta semana após infecção. Foram medidas ambas as patas traseiras, sendo que o tamanho da lesão foi expresso como a diferença entre essas medidas.

6.3.5. Mensuração da carga parasitária

Para avaliar a evolução da infecção, o número de parasitos nas lesões foi estimado pela técnica da diluição limitante. A pata com a lesão foi retirada de forma estéril, macerada em 1,5 mL de meio de Schneider e centrifugada a 1540 g durante 10 minutos a 4° C. O sedimento foi ressuspensão em 700 µl de meio de Schneider com 20% de soro bovino fetal. Em uma placa de 96 poços foi feita uma diluição limitante das amostras em triplicata. Em seguida a placa foi incubada a 25° C. Após sete dias foi realizada a leitura da placa para quantificar os promastigotas por microscopia ótica (LIMA et al., 1997).

O cálculo utilizado para a determinação da carga parasitária foi o seguinte:

$$\text{N}^\circ \text{ de parasito/ lesão} = \frac{\text{volume total da solução onde ficaram suspensas as células de toda a lesão} \times \frac{1}{\text{última diluição em que se detectou parasitos}}}{\text{volume de suspensão que ficou em cada poço}}$$

6.3.6. Dosagem de citocinas

Para determinar se os leucócitos, presentes no tecido onde a resposta imune local à *Leishmania* inoculada no coxim plantar ocorreu, produziram duas citocinas que podem estar associadas à susceptibilidade à infecção leishmaniótica (a IL-10 e a IL-4), os linfonodos poplíteos drenantes foram retirados e imersos em RPMI de forma estéril. Esses linfonodos foram macerados em RPMI, centrifugados a 300 g e o sedimento resuspenso em RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal, glutamina (2 mM), ácido pirúvico (1 mM) e HEPES (10 mM). As células dos linfonodos foram estimuladas com 5 µg/mL de anticorpos anti-CD3 (R&D Bioscience, St. Diego, CA, EUA) durante 48 horas, a 37° C, em estufa de CO₂. Os sobrenadantes dessas células foram coletados e testados para a presença de IL-4 e IL-10 em um *kit* comercial de ELISA de captura, seguindo o protocolo do fabricante (eBioscience, San Diego, Califórnia).

6.3.7. Dosagem de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-*Leishmania*

Para a semiquantificação de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-*Leishmania*, poços de placas de 96 poços foram sensibilizados, por incubação, por 16 horas a 4 °C, com 100 µL de ELA (contendo 10 µg de proteína/mL) diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,1 M), pH 9,6. As placas foram bloqueadas por incubação durante 1 hora à temperatura ambiente com 150 µL de salina a 0,15 M tamponada com fosfato, pH 7,2 (PBS), contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e 10% de gelatina. As amostras de soro foram diluídas a 1:1000 (IgG1) e 1:25 (IgG2a) em PBS-T, com 5% de gelatina, adicionadas aos poços e incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente. Os anticorpos ligados foram detectados por incubação com anticorpos anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo biotinilados (Pharmingen, Minneapolis, EUA) durante 1 hora, seguido de incubação com um conjugado de avidina-peroxidase durante 30 minutos, à temperatura ambiente. A reação foi desenvolvida em 100 µL

de tampão de citrato-fosfato (50 mM), pH 5,2, contendo o-fenilenodiamina (1,1 μM) e 0,015 mL de H_2O_2 a 30 volumes. A reação foi interrompida pela adição de 25 μL de H_2SO_4 (4 M). A absorvância a 490 nm foi registrada em um espectrofotômetro.

6.4. Espectrometria de massas

O ELa (200 μg /poço) foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% em condições desnaturantes (LAEMMLI et al., 1970), e o gel corado com azul de Coomassie e descorado com solução descorante (álcool metílico, ácido acético e água destilada), para visualização das bandas. Fragmentos de gel com bandas com pesos moleculares aparentes de 68 kDa, 45 kDa, 36 kDa e 28 kDa foram cortados e mantidos isoladamente em tubos Eppendorfs contendo uma solução de acetonitrila em bicarbonato de amônio (25 mM, proporção de 1:1 em água deionizada) até a retirada por completo do azul de Coomassie. Posteriormente, essa solução foi substituída por acetonitrila pura e os fragmentos de gel incubados por 5 minutos sob agitação a 300 rpm. O procedimento foi repetido a fim de melhor desidratar o gel. Os pedaços de gel, então, foram secados em um concentrador a vácuo.

Ditiotreitol, diluído a 10 mM em bicarbonato de amônio (25 mM), foi adicionado aos fragmentos de gel, incubado por 1 hora e depois retirado para adição de iodoacetamida a 100 mM, no mesmo diluente, com a qual os fragmentos de gel foram incubados no escuro por 45 minutos. A solução de iodoacetamida foi substituída por uma solução de bicarbonato de amônio (100 mM), ficando sob agitação a 300 rpm por 5 minutos para a remoção dos reagentes anteriores. A solução de bicarbonato de amônio foi por sua vez substituída por acetonitrila em bicarbonato de amônio a 25 mM (proporção de 1:1 em água deionizada) sob as mesmas condições de agitação e tempo. O procedimento foi repetido para completar a lavagem.

Após a lavagem, 300 μL de solução de tripsina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em bicarbonato de amônio a 25 mM (proporção de 1:100 de enzima/proteína, m:m), seguido por incubação por 30 minutos sobre gelo e por 16 a 18 horas a 37° C. Ácido fórmico foi adicionado para parar a reação e o sobrenadante coletado e reservado. Os fragmentos foram lavados com acetonitrila e água deionizada (1:1) e o sobrenadante

novamente reservado. Mais uma lavagem foi feita com acetronitrila pura, com incubação por 5 minutos e reserva do sobrenadante.

Os sobrenadantes coletados foram secados em concentrador a vácuo até que não restassem líquidos nos tubos Eppendorfs, depois dissolvidos em água deionizada com 1% de ácido fórmico e estocados a -80°C . Antes de serem analisadas no espectrômetro de massas, as amostras foram processadas em uma coluna de limpeza seguindo as instruções da coluna (Pierce C18; Thermo Scientific, Rockford, EUA). Duas amostras, preparadas independentemente, foram analisadas pelo QTOF e LTQ Orbitrap XL ETD, e os dados obtidos foram analisados em MASCOT e em MaxQuant usando bancos de dados de *Leishmania*. Uma das amostras foi analisada pela Dra. Júlia P.C. da Cunha (*Leishmania* do TriTrypDB), no Instituto Butantan, São Paulo e outra pelo Dr. Fabrício K. Marchini (*L. major* do TriTrypDB), no Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Curitiba.

6.5. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliar se a distribuição das amostras era normal. As amostras com distribuição normal foram submetidas ao teste one-ANOVA, seguido do pósteste de Bonferroni e as que não apresentaram distribuição normal foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis, seguido do pósteste de Dunn. O teste de Spearman foi utilizado para demonstrar possíveis correlações entre concentrações de citocinas e os tamanhos das lesões, o grau de parasitismo nas mesmas e as intensidades de anticorpo IgG1 anti-*Leishmania*.

7.RESULTADOS

7.1. Purificação das frações

A Figura 3 mostra o resultado de uma EGPA-DSS realizada com as frações com peso molecular aparente de 96 kDa, 68 kDa, 54 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 28 kDa, 19 kDa, 15 kDa.

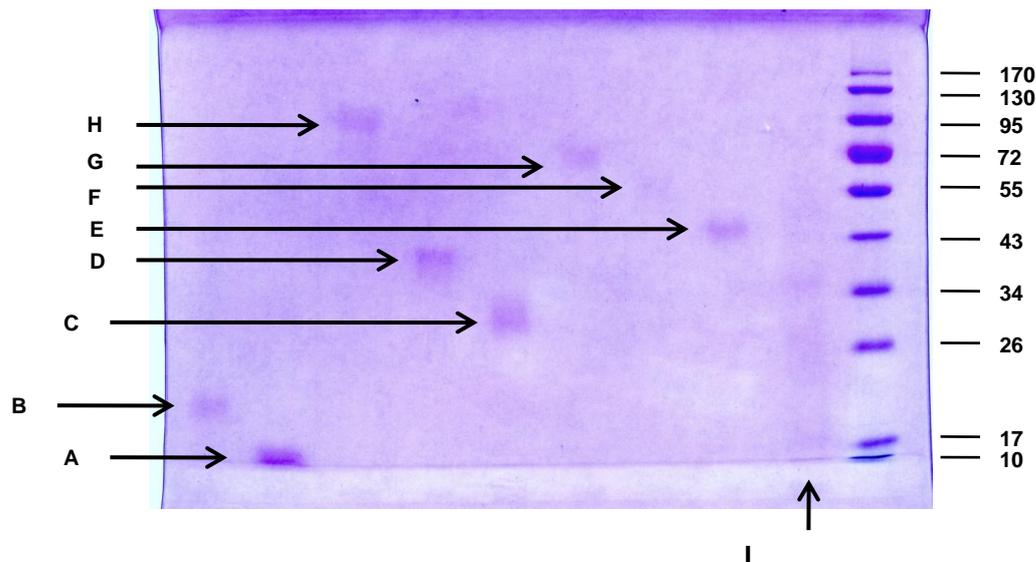


Figura 3. Gel de poliacrilamida das frações do ELA. Gel de poliacrilamida em que foi realizada eletroforese na presença de dodecil sulfato de sódio das frações, purificadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes seguida por eletroeluição com peso molecular aparente de 15 kDa (A), 19 kDa (B), 28 kDa (C), 36 kDa (D), 45 kDa (E), 54 kDa (F), 68 kDa (G), 96 kDa (H) e fração restante do ELA (FRE (I)). A última coluna mostra a posição de proteínas padrões com seus pesos moleculares em kDa, indicados a direita. Os números e as setas à esquerda informam os pesos moleculares aparentes das bandas.

7.2. Efeito potenciador da infecção das frações do ELA

Foram feitos dois experimentos para avaliar o efeito biológico sobre a infecção leishmaniótica.

7.2.1. Primeiro experimento

No primeiro experimento, foram avaliadas todas as oitos frações. Em relação ao tamanho da lesão, quando o grupo tratado com salina foi comparado com os demais grupos, houve aumento estatisticamente significativo no grupo tratado com ELA (controle positivo) e no tratado com FRE (Figura 4). Em todos os grupos de camundongos em que se injetaram frações existiam animais com espessura da pata

nitidamente maior que a de todos os cinco camundongos injetados com salina. Isto aconteceu em 1 de 4 camundongos no grupo injetado com a fração de 45 kDa, em 2 de 4 camundongos no grupo injetado com a fração de 19 kDa, em 3 de 4 camundongos nos grupos injetados com as frações de 15 e 54 kDa, e em todos os quatro camundongos nos grupos de camundongos injetados com as frações de 28 kDa, 36 kDa e 68 kDa e com a FRE.

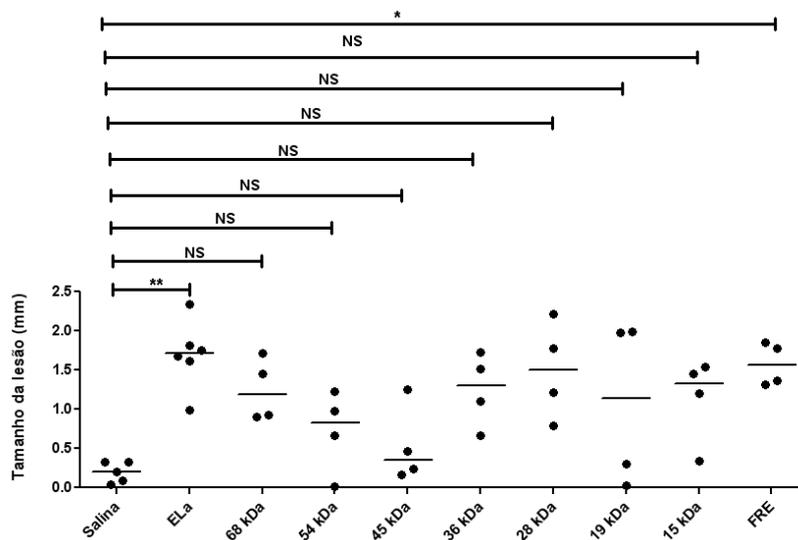


Figura 4. Tamanho da lesão do primeiro experimento das frações do ELa. Tamanhos da lesão na 6ª semana após a infecção em grupos de 4 a 6 camundongos BALB/c tratados por uma única injeção intradérmica de salina, extrato de amastigotas de *L. amazonensis* (ELa), frações de 15 kDa, 19 kDa, 28 kDa, 36 kDa, 45 kDa, 68 kDa e a fração restante do ELa (FRE). Uma semana após serem tratados os camundongos BALB/c foram infectados por 10^7 promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária de crescimento. Cada símbolo representa o resultado obtido de um único animal e as linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. As significâncias estatísticas de diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; NS, diferença não significativa

A Figura 5 mostra a carga parasitária da lesão, nos diferentes grupos de camundongos. Não houve diferenças estatisticamente significantes dos grupos experimentais e o grupo controle positivo em relação ao grupo controle negativo.

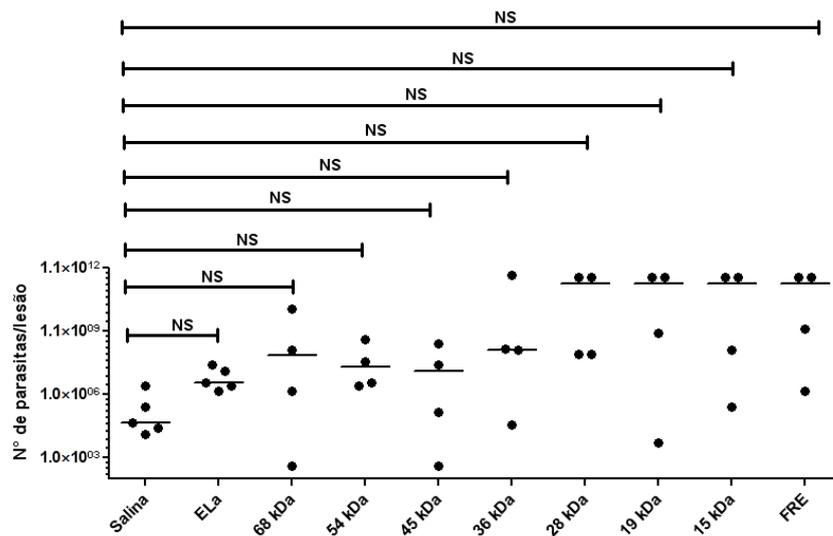


Figura 5. Carga parasitária do primeiro experimento das frações do ELa. Número de parasitos por lesão, estimado por diluição limitante da lesão, expresso em log 2, como descrito na Metodologia, na 6ª semana após a infecção, em grupos de 4 a 6 camundongos BALB/c tratados por uma única injeção intradérmica de salina, extrato de amastigotas de *L. amazonensis* (ELa), frações de 15 kDa, 19 kDa, 28 kDa, 36 kDa, 45 kDa, 68 kDa e a fração restante do ELa (FRE). Uma semana após serem tratados, os camundongos foram infectados por 10^7 promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária de crescimento. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. Cada símbolo representa o resultado obtido de um animal. As significâncias estatísticas de diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, NS, diferença não significativa.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na produção de IL-4 por células de linfonodo drenante estimuladas por anti-CD3 nos diferentes grupos (Figura 6).

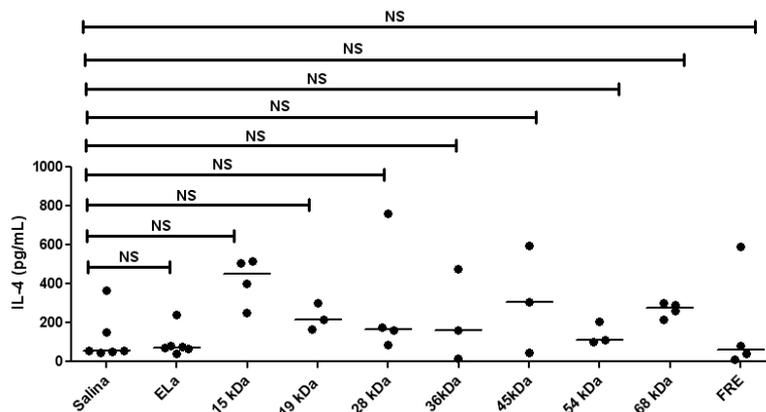


Figura 6. Produção de IL-4 do primeiro experimento das frações do ELa. Concentrações de IL-4, determinadas por ELISA, em cultura de linfonodos poplíteos estimulados com anti-CD3. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. Cada símbolo representa o resultado obtido de um animal. As significâncias estatísticas de diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, NS, diferença não significativa.

Análises de correlação linear foram realizadas para avaliar se a quantidade de IL-4 encontrava-se aumentada em culturas de células de linfonodo de animais com

maiores lesões ou com maior carga parasitária na lesão. Não foram observadas correlações entre esse parâmetros (Figura 7 e 8).

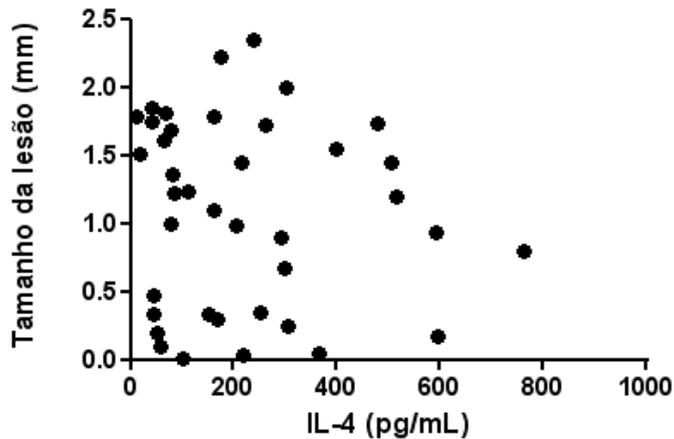


Figura 7. Correlação entre a produção de IL-4 e tamanho da lesão do primeiro experimento das frações do ELA. Ausência de correlação entre as concentrações de IL-4 em culturas de células de linfonodos drenantes e os tamanhos da lesão, na sexta semana após infecção por *L. braziliensis*. Os valores avaliados foram os obtidos de camundongos injetados intradermicamente com salina, extrato de amastigotas de *L. amazonensis*, ou frações desse extrato com 28, 36, 45 ou 68 kDa, uma semana antes da infecção. $r = -0,1575$, teste de correlação de Spearman ($p = 0,3382$).

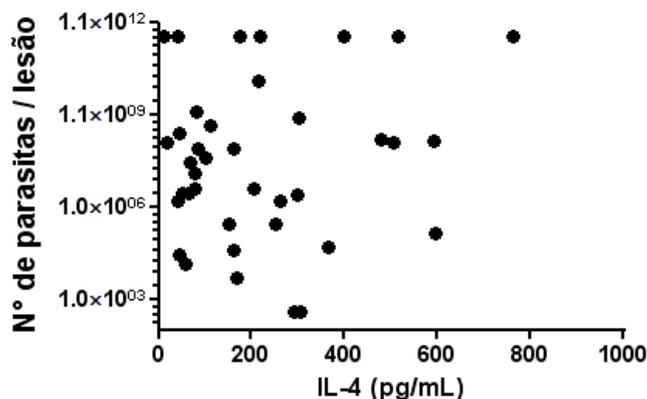


Figura 8. Correlação entre a produção de IL-4 e carga parasitária do primeiro experimento das frações do ELA. Ausência de correlação entre as concentrações de IL-4 em culturas de células de linfonodos drenantes e a carga parasitária, na sexta semana após infecção por *L. braziliensis*. Os valores avaliados foram os obtidos de camundongos injetados intradermicamente com salina, extrato de amastigotas de *L. amazonensis*, ou frações desse extrato com 28, 36, 45 ou 68 kDa, uma semana antes da infecção. $r = -0,03958$, teste de correlação de Spearman ($p = 0,8135$).

7.2.1. Segundo experimento

No primeiro experimento foi testado um número relativamente grande (8) de frações em um número reduzido (4) de animais por grupo. A conjunção desses dois fatos, associada à dispersão relativamente grande de resultados em sete dos oito grupos experimentais, pode ter dificultado a obtenção de diferenças estatisticamente

significantes entre esses sete grupos e o grupo controle negativo. Devido a este fato, um segundo experimento foi realizado com um número maior de animais por grupo ($n=8$), com o objetivo de investigar o papel potenciador das frações (de 28 kDa, 36 kDa e 68 kDa) cuja injeção, no primeiro experimento, induziram, em todos os animais, lesões maiores do que as dos animais do grupo controle negativo (injetados com apenas salina e posteriormente infectados). Foi novamente testada também a fração de 45 kDa, cuja injeção, no primeiro experimento, esteve associada a lesões menores na maioria do animais quando comparada com as lesões desenvolvidas por animais associadas injetados com as demais frações.

A figura 9 mostra o resultado do acompanhamento do tamanho da lesão da terceira até a sexta semana, após a infecção com *L. braziliensis*, nos grupos de camundongos injetados com salina, ELA e frações de 28 kDa, 36 kDa, 45 kDa e 68 kDa. Na terceira semana, os grupos cujos camundongos tiveram lesões significativamente maiores do que as do grupo controle negativo foram os grupos de animais injetados com ELA e com as frações de 28 kDa e 68 kDa. Na quarta semana, os tamanhos das lesões nos camundongos de todos os grupos experimentais foram significativamente maiores do que os das lesões do grupo controle negativo. Na quinta semana, houve redução do tamanho das lesões nos camundongos do grupo injetado com a fração de 45 kDa, não sendo o tamanho das lesões nesse grupo significativamente diferente da dos camundongos do grupo controle negativo. Na sexta semana, os camundongos dos grupos de 36 kDa e 45 kDa não tiveram agravamento estatisticamente significativo da lesão, apesar de manterem lesões maiores que as do grupo salina. Os grupos de de animais injetados com ELA, 28 kDa ou 68 kDa mantiveram agravamento estatisticamente significativo da lesão, em relação ao grupo controle negativo, da terceira até a sexta semana após a infecção.

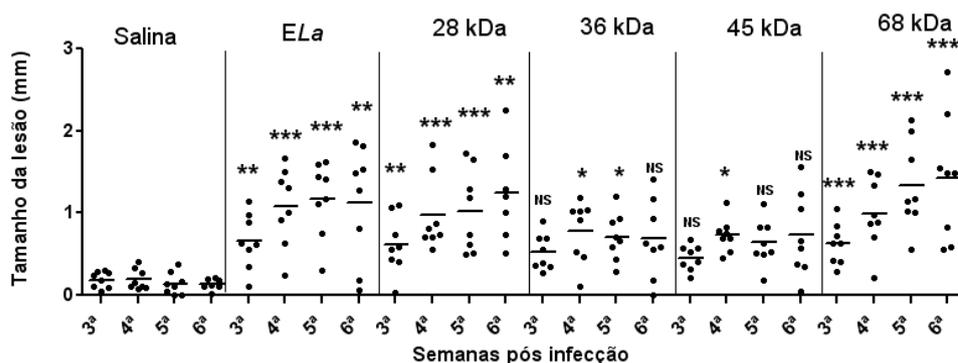


Figura 9. Tamanho da lesão segundo experimento das frações do ELA. Tamanho da lesão da 3ª a 6ª semana após a infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis*. Os animais foram injetados intradermicamente com salina (Salina), extrato de amastigotas de *L. amazonensis* (ELA), ou frações do ELA de 28 (28 kDa), 36 (36 kDa), 45 (45 kDa) ou 68 (68 kDa) kDa, uma semana antes de serem infectados por 10^7 promastigotas em fase estacionária de crescimento. As linhas horizontais representam as médias de cada grupo. Cada símbolo representa o resultado obtido de um animal. As significâncias estatísticas de diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; NS, diferença não significativa (em relação ao grupo Salina das respectivas semanas).

Em relação às cargas parasitárias na lesão, os grupos injetados com ELA e com as frações de 28, 36 e 68 kDa diferiram do grupo de camundongos injetados com salina (grupo controle negativo) de forma estatisticamente significativa (Figura 10). Já o grupo de camundongos injetados com a fração de 45 kDa não diferiu do grupo controle negativo de forma estatisticamente significativa pelo pósteste de Dunn. Entretanto, todos os camundongos desse grupo apresentaram carga parasitária maior que a máxima carga parasitária observada nos camundongos do grupo controle negativo.

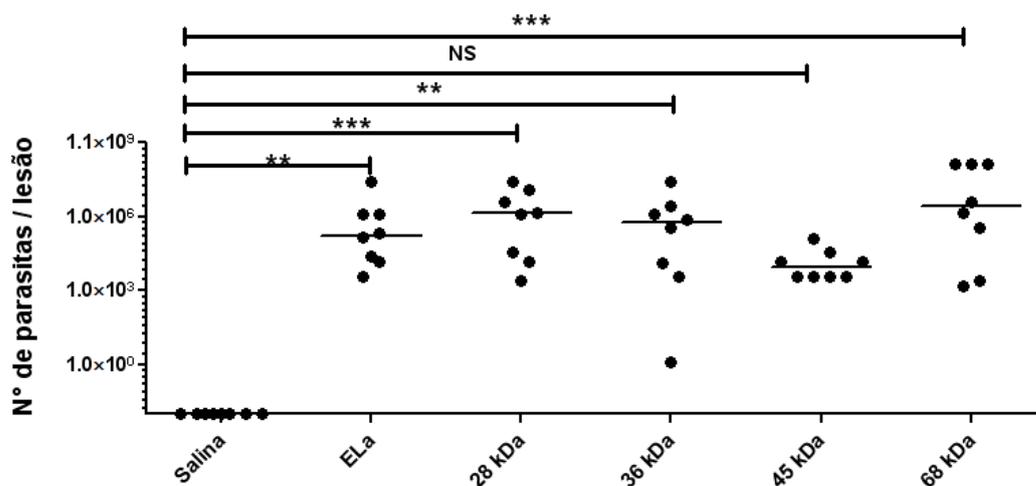


Figura 10. Carga parasitária do segundo experimento das frações do ELA. Os animais foram injetados intradermicamente com salina (Salina), extrato de amastigotas de *L. amazonensis* (ELA), ou frações do ELA de 28 (28 kDa), 36 (36 kDa), 45 (45 kDa) ou 68 (68 kDa) kDa, uma semana antes de serem infectados por 10^7 promastigotas em fase estacionária de crescimento. O número de parasitos foi estimado por diluição limitante, como descrito na Metodologia, na sexta semana pós-infecção. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. Cada símbolo representa o resultado obtido de um animal. As significâncias estatísticas de diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; NS, diferença não significativa.

A figura 11 mostra o resultado da dosagem de IL-4 do sobrenadante da cultura de células do linfonodo drenante, estimuladas com anti-CD3. Nas culturas das células de 4 dos 8 animais injetados com ELA, a concentração de IL-4 foi maior que a maior concentração encontrada no grupo controle negativo. Não houve,

porém, nenhuma diferença estatisticamente significativa entre qualquer dos grupos experimentais e o grupo controle negativo.

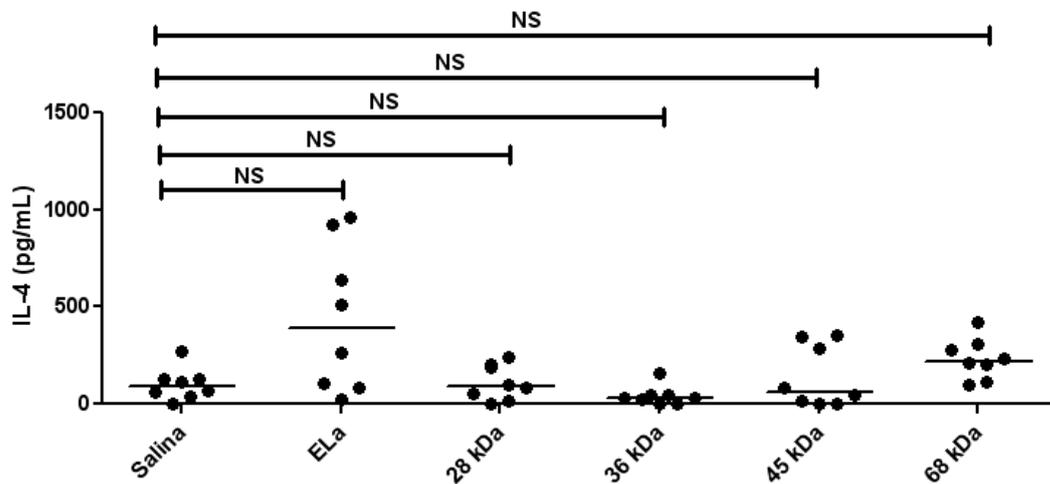


Figura 11. Produção de IL-4 do segundo experimento das frações do ELa. Concentrações de IL-4, determinadas por ELISA, nos sobrenadantes de culturas de células estimuladas por anti-CD3. As células foram obtidas de linfonodos poplíteos drenantes do sítio de lesão causada por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c. Os animais foram injetados intradermicamente com salina (Salina), extrato de amastigotas de *L. amazonensis* (ELa), ou frações do ELa de 28 (28 kDa), 36 (36 kDa), 45 (45 kDa) ou 68 (68 kDa) kDa, uma semana antes de serem infectados por 10^7 promastigotas em fase estacionária de crescimento. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. Cada símbolo representa o resultado obtido de um animal. As significâncias estatísticas de diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, NS, diferença não significativa. A diferença entre qualquer dos grupos experimentais e o grupo Salina não foi estatisticamente significativa.

Análises de correlação linear foram realizadas para avaliar se a quantidade de IL-4 encontrava-se aumentada em culturas de células de linfonodo de animais com maiores lesões ou com cargas parasitárias maiores. Foi observada uma correlação fraca, mas estatisticamente significativa ($p = 0,0055$) entre concentrações de IL-4 e tamanho de lesão (Figura 12), mas não entre concentrações de IL-4 e cargas parasitárias (Figura 13).

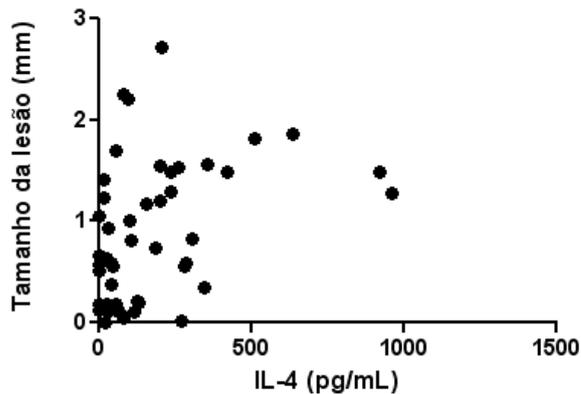


Figura 12. Correlação entre o tamanho da lesão e produção de IL-4 do segundo experimento das frações do ELA. Presença de correlação entre as concentrações de IL-4 em culturas de células de linfonodos drenantes e os tamanhos da lesão, na sexta semana após infecção por *L. braziliensis*. Os valores avaliados foram os obtidos de camundongos injetados intradermicamente com salina, extrato de amastigotas de *L. amazonensis*, ou frações desse extrato com 28, 36, 45 ou 68 kDa, uma semana antes da infecção. $r = 0,3986$, teste de correlação de Spearman ($p = 0,0055$).

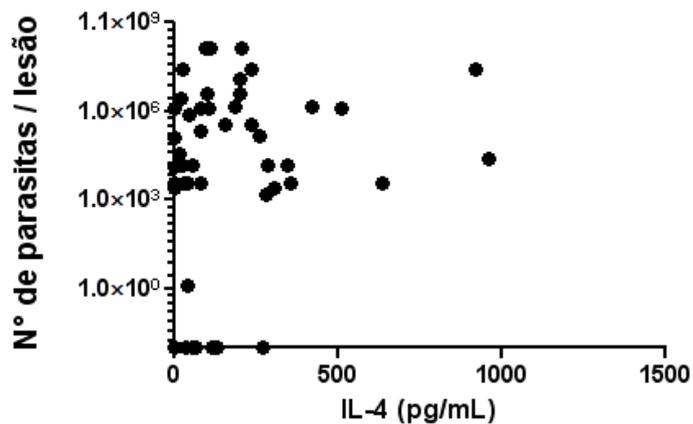


Figura 13. Correlação entre a carga parasitária e produção de IL-4 do segundo experimento das frações do ELA. Ausência de correlação entre as concentrações de IL-4 em culturas de células de linfonodos drenantes e a carga parasitária, na sexta semana após infecção por *L. braziliensis*. Os valores avaliados foram os obtidos de camundongos injetados intradermicamente com salina, extrato de amastigotas de *L. amazonensis*, ou frações desse extrato com 28, 36, 45 ou 68 kDa, uma semana antes da infecção. $r = 0,1480$, teste de correlação de Spearman ($p = 0,3155$).

A figura 14 mostra o resultado da quantificação de IL-10 no sobrenadante de cultura de células do linfonodo drenante, estimuladas com anti-CD3. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos e ocorreu uma grande variação intragrupo dos resultados.

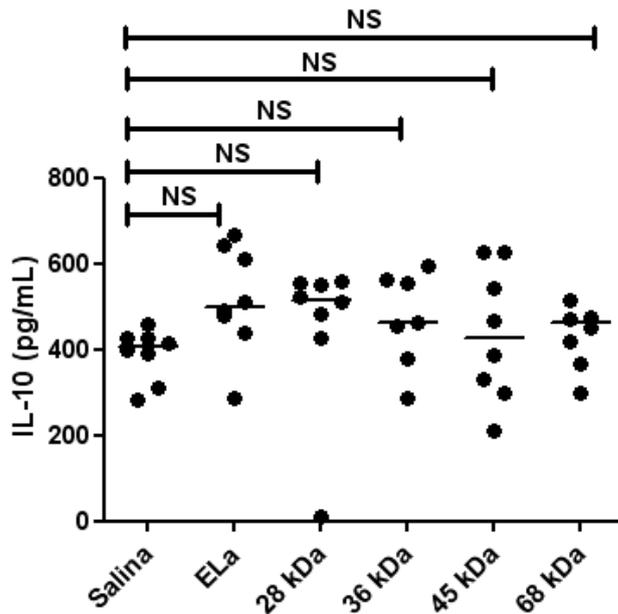


Figura 14. Produção de IL-10 do segundo experimento das frações de ELA. Concentrações de IL-10, determinadas por ELISA, da cultura em leucócitos estimulados com anti-CD3. Os leucócitos foram obtidos de linfonodos poplíteos drenantes do sítio de lesão causada por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c. Os animais foram injetados intradermicamente com salina (Salina), extrato de amastigotas de *L. amazonensis* (ELA), ou frações do ELA de 28 (28 kDa), 36 (36 kDa), 45 (45 kDa) ou 68 (68 kDa) kDa, uma semana antes de serem infectados por 10^7 promastigotas em fase estacionária de crescimento. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. Cada símbolo representa o resultado obtido de um animal. As significâncias estatísticas de diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, NS, diferença não significante..

Não foi observada correlação entre as concentrações de IL-10 nas culturas de células de linfonodo e os tamanhos das lesões. (Figura 15). Entretanto, observou-se uma correlação fraca, mas estatisticamente significativa ($p = 0,0234$), entre as concentrações de IL-10 e as cargas parasitárias nas lesões (Figura 16).

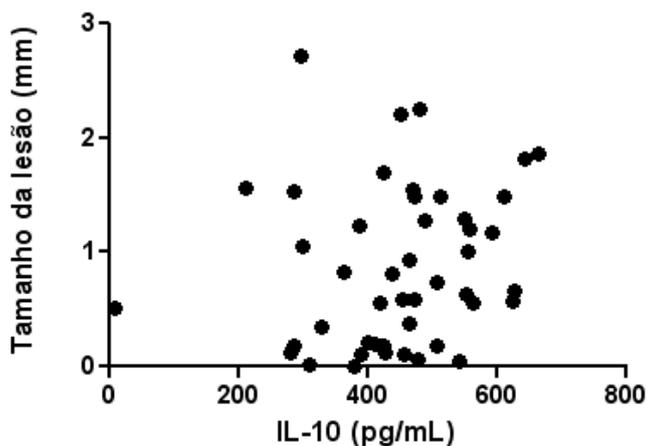


Figura 15. Correlação entre o tamanho da lesão e produção de IL-10 do segundo experimento das frações do ELA. Ausência de correlação entre as concentrações de IL-10 em culturas de células

de linfonodos drenantes e os tamanhos da lesão, na sexta semana após infecção por *L. braziliensis*. Os valores avaliados foram os obtidos de camundongos injetados intradermicamente com salina, extrato de amastigotas de *L. amazonensis*, ou frações desse extrato com 28, 36, 45 ou 68 kDa, uma semana antes da infecção. $r = 0,2318$, teste de correlação de Spearman ($p = 0,1211$).

Uma análise de correlação linear foi realizada, a fim de avaliar se a quantidade de IL-10 encontrava-se aumentada em culturas de células de linfonodo de animais com carga parasitária maiores. Nessa análise foi observada correlação estatisticamente significativa (valor de p 0,0234) entre esse dois parâmetros (Figura 16).

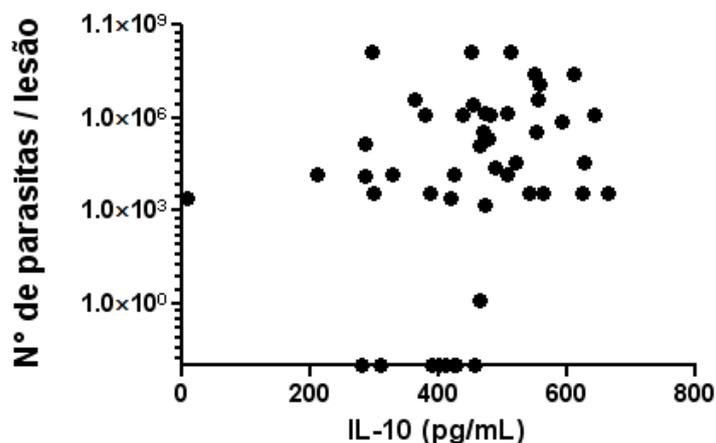


Figura 16. Correlação entre a carga parasitária e produção de IL-10 do segundo experimento das frações do ELA. Presença de correlação entre as concentrações de IL-10 em culturas de células de linfonodos drenantes e a carga parasitária, na sexta semana após infecção por *L. braziliensis*. Os valores avaliados foram os obtidos de camundongos injetados intradermicamente com salina, extrato de amastigotas de *L. amazonensis*, ou frações desse extrato com 28, 36, 45 ou 68 kDa, uma semana antes da infecção. $r = 0,3302$, teste de correlação de Spearman, valor de p 0,0234.

Os camundongos injetados com ELA ou com as frações de 28 kDa, 36 kDa ou 68 kDa, mas não os injetados com a fração de 45 kDa, apresentaram aumento estatisticamente significativo, em relação ao grupo controle negativo, das concentrações plasmáticas de anticorpo IgG1 anti-*Leishmania* (Figura 17).

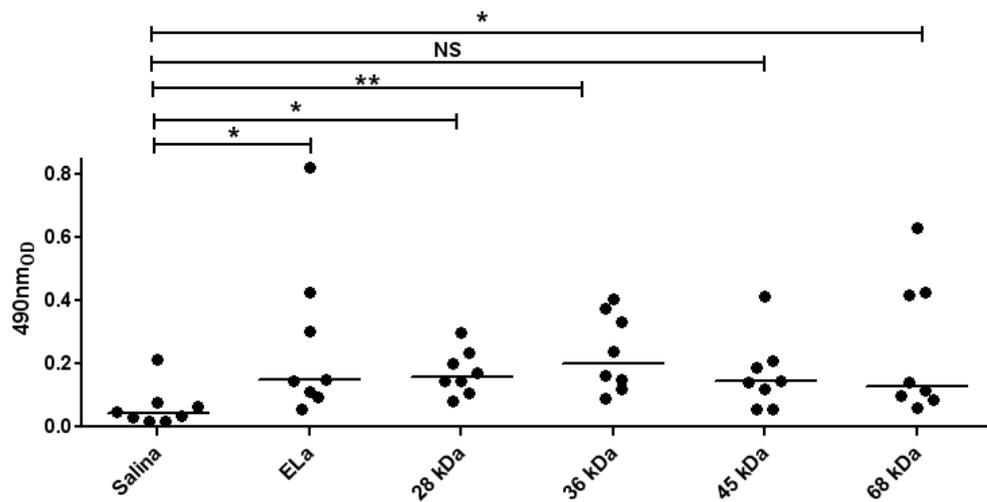


Figura 17. Semiquantificação de IgG1 do experimento das frações do ELA. Semiquantificação de anticorpos IgG1 anti-*Leishmania*, por ELISA, do soro de camundongos BALB/c. Os animais foram injetados pela via intradérmica com salina (Salina), extrato de amastigotas de *L. amazonensis* (ELA), ou frações do ELA de 28 (28 kDa), 36 (36 kDa), 45 (45 kDa) ou 68 (68 kDa) kDa, uma semana antes de serem infectados por 10^7 promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária de crescimento. Cada símbolo representa o resultado obtido de um animal e as linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; NS, diferença não significativa

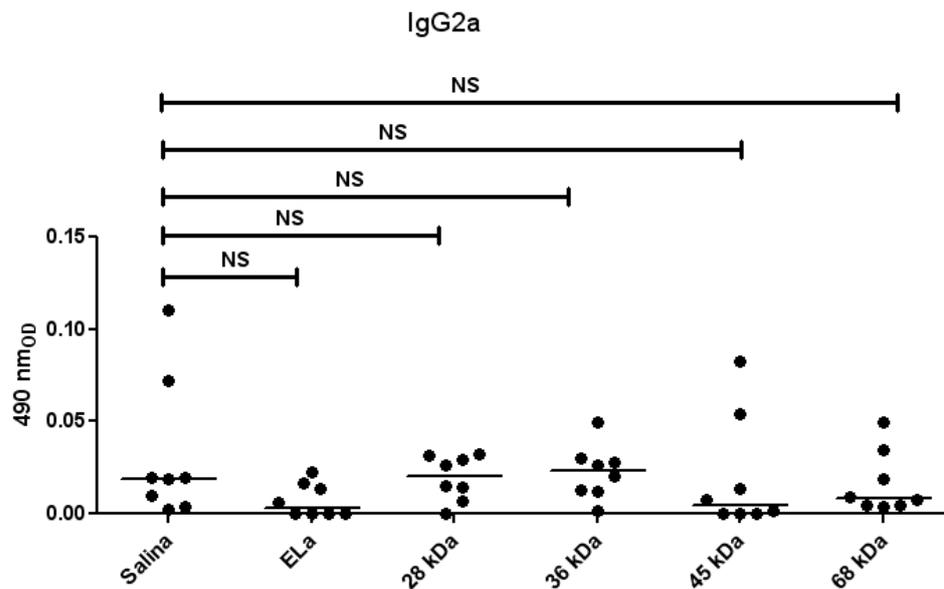


Figura 18. Semiquantificação de IgG2a do experimento das frações do ELA. Semiquantificação de anticorpos IgG2a anti-*Leishmania*, por ELISA, do soro de camundongos BALB/c. Os animais foram injetados pela via intradérmica com salina (Salina), extrato de amastigotas de *L. amazonensis* (ELA), ou frações do ELA de 28 (28 kDa), 36 (36 kDa), 45 (45 kDa) ou 68 (68 kDa) kDa, uma semana antes de serem infectados por 10^7 promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária de crescimento. Cada símbolo representa o resultado obtido de um animal e as linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. NS, diferença não significativa.

Não foi observada correlação significativa entre concentrações de IL-4 em culturas de células de linfonodo e quantificação de anticorpos IgG1 anti-*Leishmania* circulantes (Figura 19).

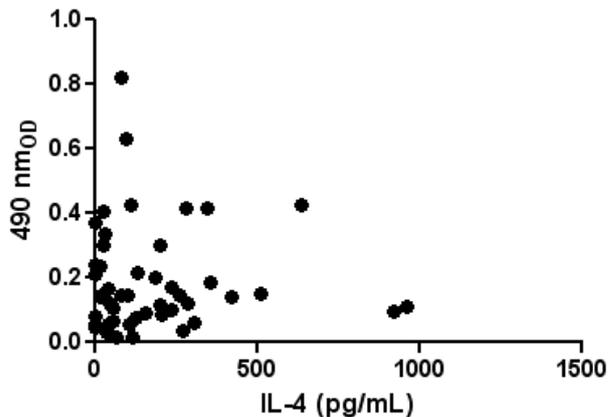


Figura 19. Correlação entre a quantificação de IgG1 e produção de IL-4 do experimento das frações do ELA. Ausência de correlação entre as concentrações de IL-4 em culturas de células de linfonodos drenantes e a semiquantificação de anticorpos IgG1 anti-*Leishmania*, na sexta semana após infecção por *L. braziliensis*. Os valores avaliados foram os obtidos de camundongos injetados intradermicamente com salina, extrato de amastigotas de *L. amazonensis*, ou frações desse extrato com 28, 36, 45 ou 68 kDa, uma semana antes da infecção. $r = 0,01086$, teste de correlação de Spearman, $p = 0,9416$.

7.3. Efeito potenciador da infecção de polipeptídeos recombinantes de *L. infantum* com e sem motivos repetitivos

A figura 20 mostra os tamanhos da lesão na sexta semana, em camundongos BALB/c injetados intradermicamente com polipeptídeos recombinantes, com ou sem motivos repetitivos de *L. infantum*, e infectados uma semana após com promastigotas de *L. braziliensis*. O grupo de camundongos injetados com o polipeptídeo com motivos repetitivos apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo. Apesar de o grupo de camundongos injetados com o polipeptídeo sem motivos repetitivos não apresentar diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo, 5 dos 6 camundongos desse grupo apresentaram lesões pelo menos seis vezes maiores que a maior lesão observada no grupo controle negativo. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos injetados com as duas construções recombinantes de cinesina.

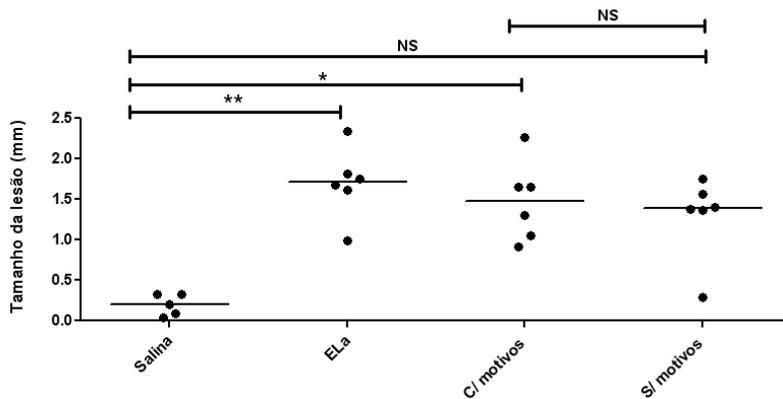


Figura 20. Tamanho da lesão do experimento com polipeptídeos da cinesina recombinantes. Tamanho da lesão na 6ª semana após infecção intradérmica com 10^7 promastigotas em fase estacionária de *L. braziliensis* em grupos de 5 ou 6 camundongos BALB/c. Os grupos de animais foram tratados com salina (Salina), extrato de amastigotas de *L. amazonensis* (ELA), polipeptídeos recombinantes de cinesina de *L. infantum* com motivos repetitivos (C/ motivos) e sem motivos repetitivos (S/ motivos). Cada símbolo representa o resultado obtido de um único animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. As significâncias estatísticas de diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; NS, diferença não significativa.

Na figura 21 observa-se que a carga parasitária no grupo de camundongos que receberam cinesina com motivos repetitivos apresenta diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos injetados com as duas construções recombinantes de cinesina.

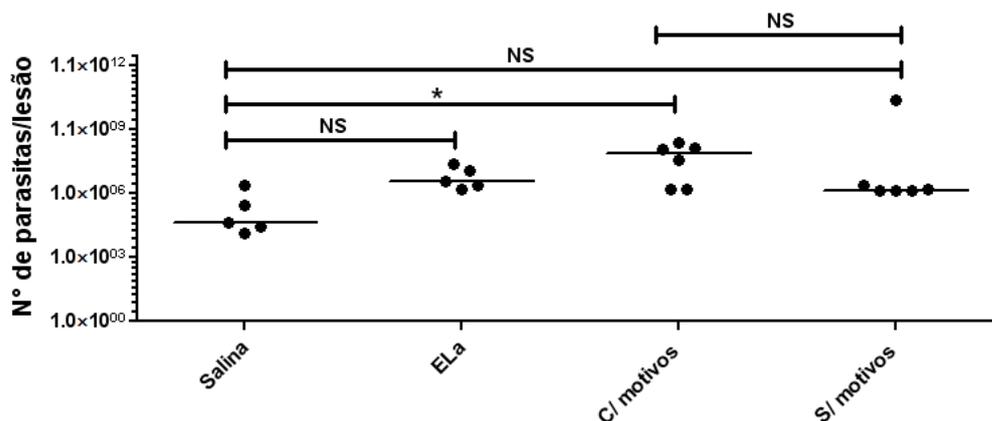


Figura 21. Carga parasitária do experimento com polipeptídeos da cinesina recombinantes. Número de parasitos por lesão, determinado por diluição limitante, como descrito na Metodologia. Grupos de 5 ou 6 animais foram tratados com salina (Salina), extrato de amastigotas de *L. amazonensis* (ELA), polipeptídeos recombinantes de cinesina de *L. infantum* com motivos repetitivos (C/ motivos) e sem motivos repetitivos (S/ motivos). As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. Cada símbolo representa o resultado obtido de um animal. As significâncias estatísticas de diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. *, $p < 0,05$; NS, diferença não significativa.

Na figura 22 estão representadas as concentrações de IL-4 em culturas de células do linfonodo drenante da lesão estimuladas com anti-CD3. Não houve diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos grupos e o grupo controle negativo, e entre os grupos injetados com as duas construções recombinantes de cinesina.

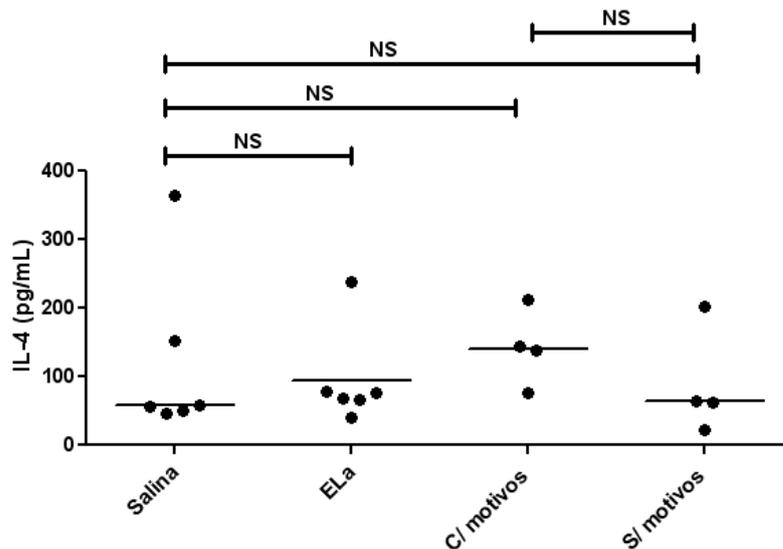


Figura 22. Produção de IL-4 do experimento com polipeptídeos da cinesina recombinantes. Concentrações de IL-4, determinadas por ELISA, em cultura de células de linfonodos poplíteos estimuladas com anti-CD3. Grupos de de 5 ou 6 animais foram tratados com salina (Salina), extrato de amastigotas de *L. amazonensis* (ELa), polipeptídeos recombinantes de cinesina de *L. infantum* com motivos repetitivos (C/ motivos) e sem domínios motivos (S/ motivos). As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. Cada símbolo representa o resultado obtido de um animal. As significâncias estatísticas de diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, NS, diferença não significativa.

7.4. Efeito promotor da infecção do extrato de *Leishmania braziliensis* (ELb)

Experimentos com o ELb foram realizados com o objetivo de investigar se um extrato de outra espécie de *Leishmania*, além do de *L. amazonensis*, tinha capacidade de promover, quando injetado por via intradérmica, a infecção por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c.

Na figura 23 podem-se ver os tamanhos da lesão na sexta semana pós-infecção com *L. braziliensis*, em camundongos injetados uma semana antes da infecção com salina, ou com 5, 30 e 186 µg (em proteína) de ELa ou ELb. O ELb só promoveu um aumento estatisticamente significativo do tamanho da lesão na dose de 5 µg, enquanto que o ELa produziu diferenças estatisticamente significativas nas

doses de 5 μg e 30 μg . Também foi observado diferenças entre as doses de 5 μg e 186 μg , a qual foi estatisticamente significativa.

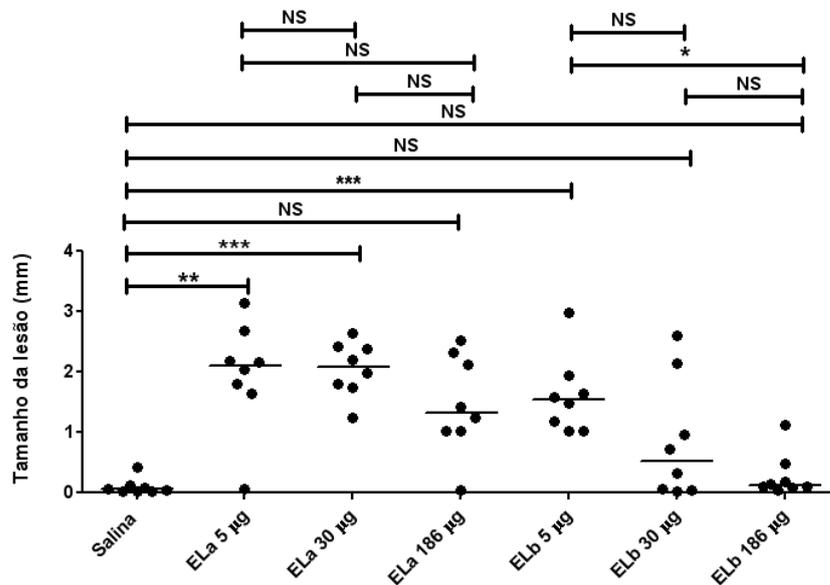


Figura 23. Tamanho da lesão do experimento com ELb. Tamanhos da lesão na 6ª semana após a infecção em grupos de 8 camundongos BALB/c. Os grupos de animais foram injetados por via intradérmica com salina (Salina) e com extratos de *L. braziliensis* (ELb) e de *L. amazonensis* (ELA) contendo 5, 30 e 186 μg de proteína, uma semana antes de serem infectados com 10^7 promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária de crescimento. Cada símbolo representa o resultado obtido de um único animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. As significâncias estatísticas de diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; NS, diferença não significativa.

Na figura 24, em que as cargas parasitárias nas lesões estão representadas, pode-se observar que ocorreram diferenças estatisticamente significantes entre cada um dos grupos experimentais e o grupo salina. Os camundongos do grupo de animais que receberam 5 μg de ELb, entretanto, apresentaram um maior aumento de carga parasitária que os animais que receberam as demais doses do mesmo extrato. Enquanto todos os oito camundongos que receberam 5 μg de ELb apresentaram carga parasitária igual ou superior um milhão de parasitos por lesão, seis dos oito que receberam 186 μg apresentaram carga parasitária inferior a um milhão de parasitos por lesão. Não houve diferenças significantes entre o grupo de oito camundongos que receberam 186 μg de ELA e o grupo dos oito que receberam 5 μg .

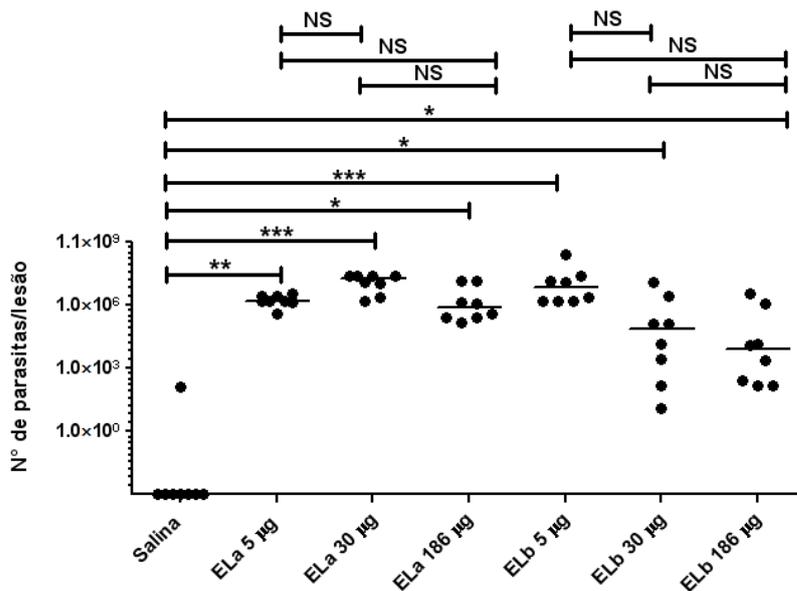


Figura 24. Carga parasitária do experimento com ELb. Número de parasitos por lesão, determinado por diluição limitante como descrito na Metodologia. Os grupos de animais foram injetados por via intradérmica com salina (Salina) e com extratos de *L. braziliensis* (ELb) e de *L. amazonensis* (ELA) contendo 5, 30 e 186 µg de proteína, uma semana antes de serem infectados com 10^7 promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária de crescimento. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. Cada símbolo representa o resultado obtido de um animal. As significâncias estatísticas de diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

7.5. Efeito promotor da infecção de frações do ELa tratadas com inibidores de serina ou cisteína proteases

Foi mostrado em nosso laboratório que o efeito potenciador da infecção do ELa é inibido quando ele é incubado com inibidores de serina proteases e injetado intravenosamente. As frações de 28 kDa e 68 kDa foram as mais potentes quanto ao efeito potenciador da infecção (item 7.2.1.). A existência de serina e cisteína proteases de *Leishmania* com peso de 68 e 28 kDa, respectivamente, foi descrita na literatura. Os experimentos cujos resultados são descritos a seguir foi realizado para investigar se essas frações continham serina ou cisteína proteases, cujas atividades poderiam ser importantes para a promoção da lesão, e se o ELa tinha sua ação promotora da infecção inibida por inibidores de protease quando injetado intradermicamente.

O ELa teve sua capacidade de agravar a lesão, que é reduzida quando tratado e injetado com inibidores de serina protease (Figura 25). No entanto, quando os camundongos foram tratados com ELa na presença de um inibidor de cisteína

protease, eles apresentaram lesões de tamanhos semelhantes aos do grupo controle positivo (de camundongos injetados com *ELa* sem inibidores de proteases).

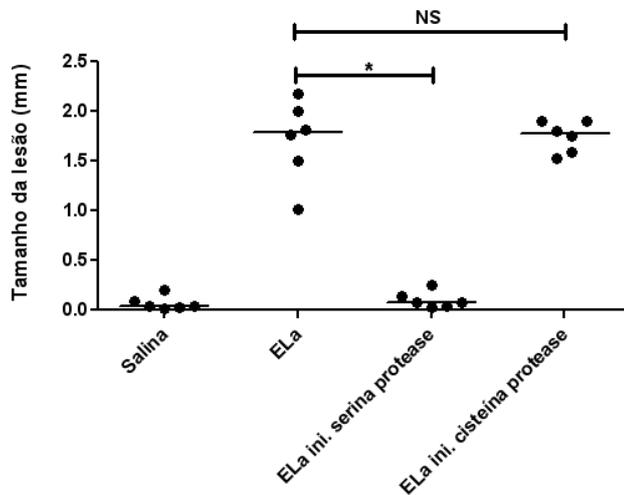


Figura 25. Tamanho da lesão do *ELa* tratados com inibidores de serina ou cisteína proteases. Tamanhos das lesões na 6ª semana após a infecção em grupos de 6 camundongos BALB/c. Os animais foram injetados por via intradérmica com salina (Salina), extrato de amastigotas de *L. amazonensis* (*ELa*) ou com *ELa* na presença de inibidores de serina protease (*ELa* ini. serina protease) ou com inibidor de cisteína protease (*ELa* ini. cisteína protease), uma semana antes de serem infectados com 10^7 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. braziliensis*. Cada símbolo representa o resultado obtido de um único animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. As significâncias estatísticas de diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. *, $p < 0,05$; NS, diferença não significativa.

A figura 26 mostra que a fração de 28 kDa teve sua capacidade de agravar a lesão reduzida quando tratada com inibidor de serina protease. No entanto, quando tratados com *ELa* na presença de inibidor com cisteína protease, alguns camundongos apresentaram lesões de tamanho semelhante às do grupo controle positivo (de camundongos injetados com fração de 28 kDa sem inibidores de proteases), não havendo diferença estatisticamente significativa entre os tamanhos de lesão observados nesses dois grupos.

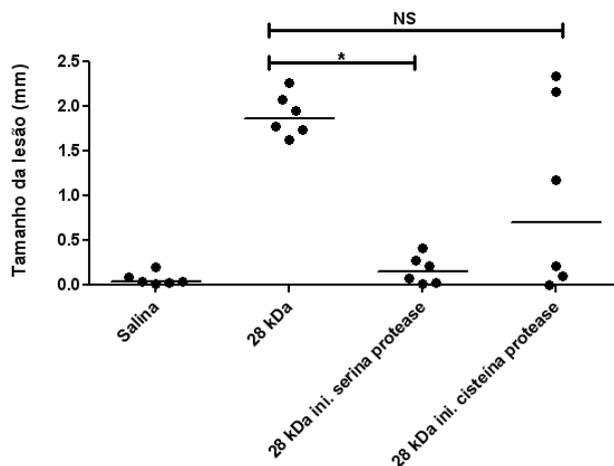


Figura 26. Tamanho da lesão da fração de 28 kDa tratados com inibidores de serina ou cisteína proteases. Tamanhos das lesões na 6ª semana após a infecção em grupos de 6 camundongos BALB/c. Os animais foram injetados por via intradérmica com salina (Salina), frações de 28 (28 kDa) ou com frações de 28 na presença de inibidores de serina protease (28 kDa ini. serina protease) ou com inibidor de cisteína protease (28 kDa ini. cisteína protease), uma semana antes de serem infectados com 10^7 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. braziliensis*. Cada símbolo representa o resultado obtido de um único animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. As significâncias estatísticas de diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. *, $p < 0,05$; NS, diferença não significativa.

Todos os seis camundongos injetados a fração de 68 kDa na presença do inibidor de serina protease apresentaram lesões de tamanhos semelhantes (lesões com tamanho de até 0,2 mm) às do grupo controle negativo, enquanto 4 dos 6 camundongos do grupo controle positivo (de camundongos injetados com fração de 68 kDa sem inibidores de proteases) desenvolveram lesões com tamanhos superiores a 1,6 mm (Figura 27). A diferença entre os dois grupos, porém, não foi estatisticamente significativa. Todos os seis animais do grupo de camundongos tratados com ELa na presença de inibidor de cisteína protease apresentaram lesões com tamanhos semelhantes às dos quatro camundongos com maiores lesões do grupo controle positivo .

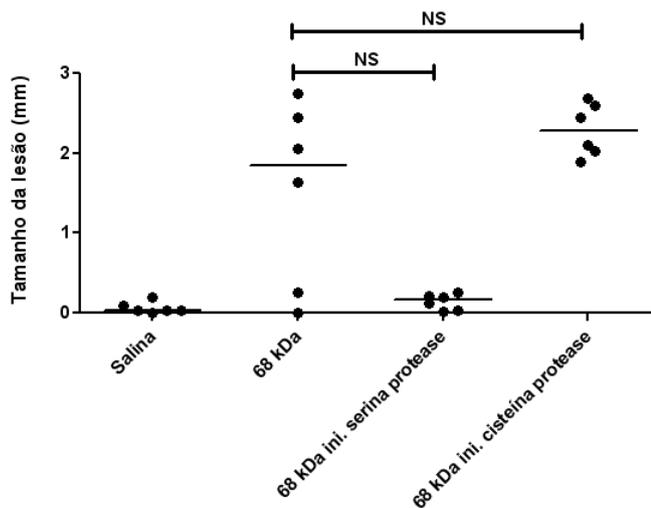


Figura 27 Tamanho da lesão da fração de 68 kDa tratados com inibidores de serina ou cisteína proteases. Tamanhos das lesões na 6ª semana após a infecção em grupos de 6 camundongos BALB/c. Os animais foram injetados por via intradérmica com salina (Salina), 68 (68 kDa) kDa ou com 68 kDa na presença de inibidores de serina protease (68 kDa ini. serina protease) ou com inibidor de cisteína protease (68 kDa ini. cisteína protease), uma semana antes de serem infectados com 10^7 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. braziliensis*. Cada símbolo representa o resultado obtido de um único animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. As significâncias estatísticas de diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. NS diferença não significativa.

Todos os seis animais que receberam ELa na presença de inibidores de serina protease apresentaram cargas parasitárias nas lesões menores (todas com menos de 13 parasitos por lesão) que os seis animais que receberam ELa isoladamente (todos com mais de 272 parasitos por lesão; Figura 28). Esta diferença, apesar de nítida, não foi estatisticamente significativa. Todos os seis animais do grupo de camundongos tratados com ELa na presença de inibidor de cisteína protease apresentaram lesões com tamanhos semelhantes às dos camundongos do grupo controle positivo.

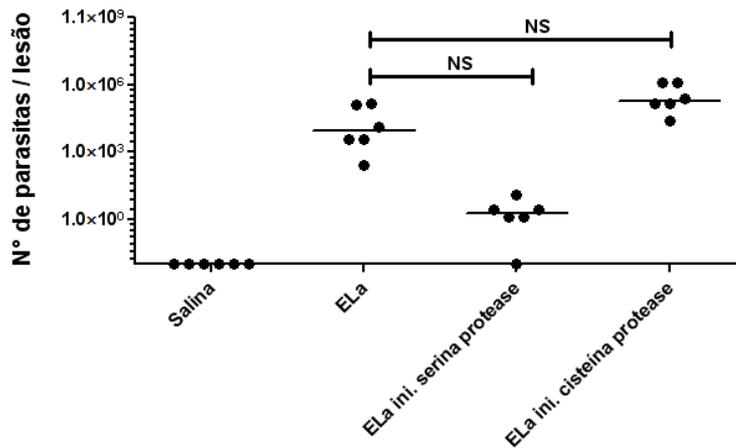


Figura 28. Carga parasitária do ELa tratados com inibidores de serina ou cisteína proteases. Número de parasitos por lesão, determinado por diluição limitante, como descrito na Metodologia. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. Cada símbolo representa o resultado obtido de um animal. Os animais foram injetados por via intradérmica com salina (Salina), extrato de amastigotas de *L. amazonensis* (ELa) ou com ELa na presença de inibidores de serina protease (ELa ini. serina protease) ou com inibidor de cisteína protease (ELa ini. cisteína protease), uma semana antes de serem infectados com 10^7 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. braziliensis*. As significâncias estatísticas de diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. NS, diferença não significativa.

Os inibidores de serina protease reduziram, de forma estatisticamente significativa, as capacidades das frações de 28 e 68 kDa em aumentar a carga parasitária. O inibidor de cisteína protease não interferiu nessa atividade das duas frações (figuras 29 e 30).

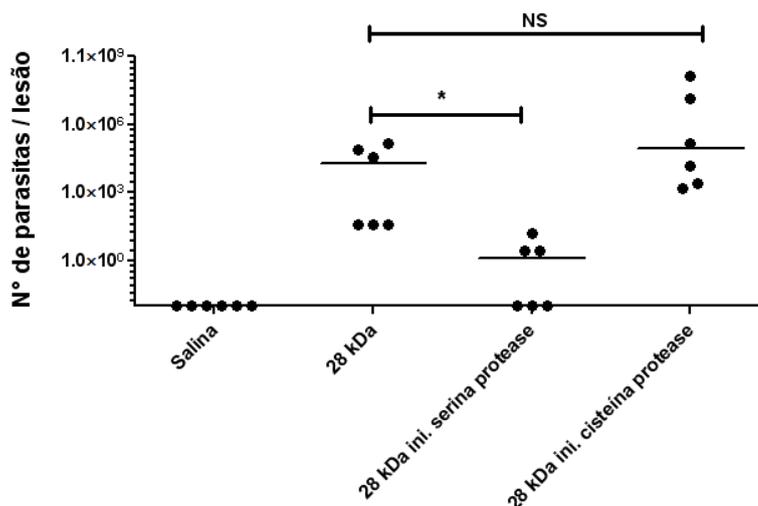


Figura 29. Carga parasitária da fração 28 kDa tratados com inibidores de serina ou cisteína proteases. Número de parasitos por lesão, determinado por diluição limitante, como descrito na Metodologia. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. Cada símbolo representa o resultado obtido de um animal. Os animais foram injetados por via intradérmica com salina (Salina), frações de 28 (28 kDa) ou com frações de 28 na presença de inibidores de serina

protease (28 kDa ini. serina protease) ou com inibidor de cisteína protease (28 kDa ini. cisteína protease), uma semana antes de serem infectados com 10^7 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. braziliensis*. As significâncias estatísticas de diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. *, $p < 0,05$; NS, diferença não significativa.

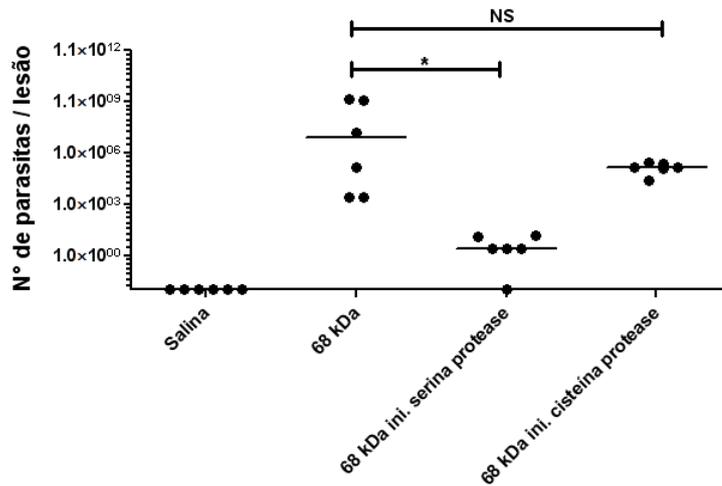


Figura 30. Carga parasitária da fração 68 kDa tratados com inibidores de serina ou cisteína proteases. Número de parasitos por lesão, determinado por diluição limitante, como descrito na Metodologia. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. Cada símbolo representa o resultado obtido de um animal. Os animais foram injetados por via intradérmica com salina (Salina), 68 (68 kDa) kDa ou com 68 kDa na presença de inibidores de serina protease (68 kDa ini. serina protease) ou com inibidor de cisteína protease (68 kDa ini. cisteína protease), uma semana antes de serem infectados com 10^7 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. braziliensis*. As significâncias estatísticas de diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. *, $p < 0,05$; NS, diferença não significativa.

7.6. Espectrometria de massas de frações de extrato de *L. amazonensis*

Nas tabelas 1, 2, 3 e 4 encontram-se listados os polipeptídeos identificados por espectrometria de massas nas frações do ELA de 28, 36, 45 e 68 kDa, respectivamente. Foram identificados 15 polipeptídeos diferentes na fração de 28 kDa, 17 na fração de 36 kDa, 18 na fração de 45 kDa e seis na fração de 68 kDa. Em nenhuma das frações foram identificadas serina ou cisteína proteases. HSP70, ou fragmentos da mesma, foram identificados em todas as frações, enquanto alfa e beta tubulinas, ou fragmentos das mesmas, foram identificadas nas frações de 28, 36 e 45 kDa.

Tabela 1. Fração de 28 kDa. Polipeptídeos identificados por espectrometria de massas, usando o banco de dados *Leishmania* do TriTrypDB e *L. major* do TriTrypDB, na fração de 28 kDa, obtida de extrato de *L. amazonensis* por eletroforese e eletroeluição

PROTEÍNA	kDa	ESCORE*	INTENSIDADE**	LOCALIZAÇÃO
Proteína semelhante a proteína 14-3-3	29,7	304	-	LmjF.36:1283014-1283790(-)
HSP70	71,8	279	-	LmjF.28:1056925-1058901(-)
NADH-citocromo b5 redutase	32,1	144	-	LmjF.22:315686-316555(-)
Subunidade da alfa tubulina, componente E1 da piruvato desidrogenase	43,3	69	-	LmjF.18:613924-615060(+)
Ascorbato peroxidase	34,3	49	-	LmjF.34:22865-23776(+)
Proteína 1 carreadora ADP/ATP, precursora mitocondrial, translocase 1 ADP/ATP	35,2	-	187240000	LmjF.19.0200
alfa tubulina	50,2	-	163650000	LmjF.13.0280
HSP83	80,9	-	151970000	LmjF.33.0312
beta tubulina	50,3	-	141440000	LmjF.08.1230
frutose-1,6-bisfosfato aldolase	40,8	-	108320000	LmjF.36.1260
gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, glicosomal	39,4	-	86010000	LmjF.30.2970
Fator 2 de alongamento	94,9	-	83376000	LmjF.36.0180
Proteína 78 reguladora de glicose	72	-	66922000	LmjF.28.1200
Carboxiquinase fosfoenolpiruvato glicosomal	58,6	-	37795000	LmjF.27.1805
Prostaglandina alfa f2 sintase/D-arabinose desidrogenase	31,8	-	37663000	LmjF.31.2150

*, Indica a probabilidade de que as proteínas identificadas não são um evento randômico. Os escores individuais os ions > 25 indicam identidade ou extensão homóloga (p <0,05).

** , Quantidades de íons detectados.

Tabela 2. Fração de 36 kDa. Polipeptídeos identificados por espectrometria de massas, usando o banco de dados *Leishmania* do *TriTrypDB* e *L. major* do *TriTrypDB*, na fração de 36 kDa, obtida de extrato de *L. amazonensis* por eletroforese e eletroeluição

PROTEÍNA	kDa	ESCORE*	INTENSIDADE**	LOCALIZAÇÃO
HSP83	80,9	741		LmjF.33:113895-116000(-)
Homólogo de receptor de quinase C ativado de <i>Leishmania</i> LACK), proteína semelhante à subunidade beta da proteína de ligação do nucleotídeo guanina	34,8	188		LmjF.28:1046693-1047631(-)
glyceraldeide 3 fosfato dehidrogenase, glicosomal	39,3	136		LmjF.30:1120527-1121612(-)
Precursora de exofre e ferro	34	135		LmjF.35:666887-667780(-)
Hidrolase de nucleosídeo inespecífica	34,5	87		LmjF.18:706392-707336(+)
Malatodehidrogenase	33,6	82		LmjF.34:46032-46985(+)
Maleatodehidrogenase mitocondrial	34,2	82		LmjF.34:53516-54493(+)
Subunidade catalítica 2ª da proteína fosfatase	35,6	80		LmjF.32:1195385-1196311(+)
Dehidrogenase dihidrootato	35	52		LmjF.16:191978-192940(-)
Proteína hipotética	35,2	52		LmjF.10:545949-546896(+)
Cadeia pequena da redutase de difosfato-ribonucleósídeo	44,7	30		LmjF.22:531615-532793(-)
HSP70	71,7	-	3395400000	LmjF.28.2770
frutose-1,6-bifosfato aldolase	40,8	-	1852400000	LmjF.36.1260
alfa tubulina	50	-	1205800000	LmjF.13.0280
beta tubulina	50	-	1168900000	LmjF.08.1230
transaldolase	37	-	4543400000	LmjF.16.0760
Subunidade 8 ATPase reguladora de proteossoma, subunidade 26 S não ATPase reguladora de proteossoma putativa	40	-	4237100000	LmjF.32.0390
Fator 4a de iniciação eucariótico	45,3	-	2964000000	LmjF.01.0770

*, Indica a probabilidade de que as proteínas identificadas não são um evento randômico. Os escores individuais os íons > 25 indicam identidade ou extensão homóloga (p <0,05).

** , Quantidades de íons detectados.

Tabela 3. Fração de 45 kDa. Polipeptídeos identificados por espectrometria de massas, usando o banco de dados *Leishmania* do *TriTrypDB* e *L. major* do *TriTrypDB*, na fração de 45 kDa, obtida de extrato de *L. amazonensis* por eletroforese e eletroeluição,

PROTEÍNA	kDa	ESCORE*	INTENSIDADE**	LOCALIZAÇÃO
HSP70	71,8	453	-	LmjF.28:1056925-1058901(-)
Amidohidrolase	45,5	156	-	LmjF.20:727619-728866(-)
Beta tubulina	50,3	102	-	LmjF.08:552499-553830(+)
Proteína disulfeto isomerase	52,7	94	-	LmjF.36:2662351-2663784(-)
Fosfoenolpiuvato carboxiquinase glicosomal	58,6	84	-	LmjF.27:772225-773802(-)
Enolase	46,6	77	-	LmjF.14:502845-504134(+)
Alfa tubulina	50,5	71	-	LmjF.13:91772-93127(-)
Hexoquinase	52,2	52	-	LmjF.21:81248-82663(+)
Carboxipeptidase, putativa, metalopeptidase, Clan MA(E), família 32	57	-	69071000	LmjF.19.1530
Proteína semelhante a peptidilproil isomeras	47,7	-	69678000	LmjF.28.1200
Calreticulina, putative	45,1	-	93816000	LmjF.18.0510
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicosomal	39,4	-	131020000	LmjF.30.2970
Subunidade 5 não ATPase reguladora de proteasoma putative, subunidade 19S não ATPase reguladora de proteasoma	54,3	-	131440000	LmjF.21.0760
Amino-peptidase, putativa, metalopeptidase, Clan MG, Família M24	42,5	-	145730000	LmjF.19.0160
Hidrolase S-adenosilhomocisteine	47,8	-	177320000	LmjF.36.3910
Dihidrolipoamida desidrogenase, putativa	50,6	-	286690000	LmjF.32.3310
Precursor mitocondrial de aldeído desidrogenase	54,1	-	335150000	LmjF.25.1120

*, Indica a probabilidade de que as proteínas identificadas não são um evento randômico. Os escores individuais os íons > 26 indicam identidade ou extensão homologa (p <0,05).

** , Quantidades de íons detectados.

Tabela 4. Fração de 68 kDa. Polipeptídeos identificados por espectrometria de massas, usando o banco de dados *Leishmania* do *TriTrypDB* e *L. major* do *TriTrypDB*, na fração de 68 kDa, obtida de extrato de *L. amazonensis* por eletroforese e eletroeluição,

PROTEÍNA	kDa	ESCORE*	INTENSIDADE**	LOCALIZAÇÃO
HSP70	71,8	2214	-	LmjF.28:1056925-1058901(-)
HSP83	80,9	359	-	LmjF.33:113895-116000(-)
Precursor mitocondrial da proteína 1 relacionada a proteína de choque térmico 70	72,3	204	-	LmjF.30:955837-957825(-)
Flavoproteína succinato desidrogenase	67,6	91	-	LmjF.24:610671-612494(+)
Pirofosfatase 1 do tipo vacuolar transportador de próton, putativa	83,6	-	21153000	LmjF.31.1220
ATPase de retículo endoplasmático, putativa, proteína homóloga contendo valosina	86,8	-	19147000	LmjF.36.1370

*, Indica a probabilidade de que as proteínas identificadas não são um evento randômico. Os escores individuais os íons > 24 indicam identidade ou extensão homologa (p <0,05).

** , Quantidades de íons detectados.

8.DISCUSSÃO

Neste trabalho de dissertação foram inicialmente estudados grupos de quatro camundongos injetados com cada uma de oito frações purificadas e um extrato de amastigostas de *L. amazonensis* e posteriormente infectados com *L. braziliensis*. Observou-se que de um a quatro animais, em todos esses grupos, desenvolveram lesões no sítio de inoculação de *L. braziliensis* maiores que a maior lesão observada no grupo controle (formado por cinco camundongos injetados apenas com salina e posteriormente infectados). A proporção de animais com doença mais intensa nos grupos de camundongos injetados com as frações foi, portanto, diferente da do grupo controle: de um total de 32 camundongos injetados com as frações, 25 (78%) desenvolveram lesões maiores que 0,5 mm, enquanto todos os cinco camundongos do grupo controle desenvolveram lesões menores que 0,5 mm. Do mesmo modo, enquanto o maior valor do parasitismo tecidual observado no grupo controle foi de cerca de 2 milhões de parasitos por lesão, 23 dos 32 (72%) animais injetados com uma das frações tiveram parasitismo tecidual mais intenso que esse, sendo que em 20 (63%) desses animais o parasitismo foi superior a 100 milhões de parasitos por lesão. Entretanto, provavelmente devido à conjunção do número relativamente grande de frações testadas, do número relativamente pequeno de animais compondo cada grupo experimental e do alto grau de dispersão dos resultados intragrupo, diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle negativo e as frações de 15, 19, 28, 36, 45, 54 e 68 kDa não foram observadas. Corroborando esta última afirmativa, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os tamanhos das lesões nos grupos de camundongos injetados com ELa (em que, apesar da dispersão dos resultados ter sido grande, era composto por seis e não por apenas quatro animais) ou injetados com a FRE (em que a dispersão dos resultados foi menor do que as nos outros grupos) e os tamanhos das lesões no grupo controle negativo. Para permitir a obtenção de resultados estatisticamente significantes, um segundo experimento foi realizado com um número menor de grupos experimentais e com um número maior de camundongos por grupo. Neste segundo experimento, três grupos experimentais foram injetados com as três frações que, no primeiro experimento, foram injetadas em camundongos de grupos em que todos os animais apresentaram lesões maiores que 0,5 mm (as frações de 28, 36 e 68 kDa). Além dessas três frações, foi escolhida,

como possível controle negativo, a fração de 45 kDa, que tinha sido injetada nos quatro camundongos de um grupo em que apenas um animal desenvolveu lesão maior que 0,5 mm. Dessa forma, este segundo experimento ficou com um total de apenas seis grupos (três experimentais, um controle positivo, um possível controle negativo e um controle negativo), enquanto no primeiro experimento havia um total de dez grupos. Neste segundo experimento, diferenças estatisticamente significantes em relação ao tamanho da lesão, à carga parasitária e à atividade de anticorpo anti-*Leishmania* da subclasse IgG1 foram observadas para todas as quatro frações, com exceção da fração de 45 kDa quanto à carga parasitária e aos anticorpos IgG1. A fração de 45 kDa, portanto, parece possuir uma atividade potenciadora da infecção mais fraca que as frações de 28, 36 e 68 kDa. No entanto, não-houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais e o grupo controle negativo quanto às concentrações de IL-4 e IL-10. Os resultados referentes à produção de IL-4 estão em desacordo com os obtidos por Silva e colaboradores (2011), que mostraram que a citocina IL-4 modula a infecção de *L. braziliensis* em camundongos BALB/c quando o extrato de *L. amazonensis* é administrado por via intravenosa. Entretanto, não obstante essa ausência de diferenças significantes entre os grupos experimentais e o grupo controle em relação à produção de IL-4, o aumento dos títulos de anticorpos IgG1 anti-*Leishmania* no sangue dos camundongos injetados com as frações de 28, 36 e 68 kDa pode ser indicativo de que essas frações são capazes de estimular uma resposta imune Th2. O fato de não ter sido observada correlação entre as concentrações desses anticorpos e as concentrações de IL-4 poderia ser devido a diferentes cinéticas de produção dessas moléculas (os anticorpos vão se acumulando no decorrer dos dias, enquanto que as células produtoras de IL-4 podem ser inicialmente estimuladas e depois serem inibidas por mecanismos regulatórios). Apesar de nos experimentos aqui descritos não ter sido possível atribuir a atividade potenciadora da infecção do ELA à produção de IL-4, em um de dois experimentos sobre o efeito potenciador da infecção das frações do ELA, foi vista uma correlação estatisticamente significante, apesar de fraca, entre as concentrações de IL-4 em culturas de linfonodos drenantes da lesão e os tamanhos das lesões nos camundongos infectados. As concentrações de IL-4 não se correlacionaram, entretanto, com a carga parasitária na lesão, o que pode indicar um envolvimento principal dessa citocina no desenvolvimento do processo inflamatório. Outros

autores, entretanto, associaram a produção de IL-4 com a proliferação parasitária (SCOTT et al., 1988; SCOTT et al.; 1989). Da mesma forma, apesar de não terem sido observadas diferenças nas concentrações de IL-10 em culturas de linfonodos drenantes nos diferentes grupos de animais, observou-se uma correlação entre as cargas parasitárias na lesão e a produção dessa citocina. Estes dados estão parcialmente de acordo com os de Pinheiro e colaboradores (2005), que observaram aumento da lesão e elevação da carga parasitária em camundongos BALB/c, quando esses animais foram sensibilizados com antígeno de *Leishmania* e infectados com *L. amazonensis*, com aumento da produção de IL -10 por células dos linfonodos drenantes da lesão. Também corroborando os dados aqui apresentados, camundongos C57BL/6 deficientes para IL-10 infectados com *L. amazonensis* (JONES et al., 2002) ou camundongos BALB/c tratados com anticorpos anti-IL-10 e infectados com *L. major* (CHATELAIN, MAUZE e COFFMAN, 1999), continuaram a desenvolver lesões persistentes. O mecanismo da potenciação da infecção no modelo experimental utilizado neste trabalho de dissertação não ficou, portanto, esclarecido. Seria importante, para esse esclarecimento, dosar a produção de TGF- β em culturas de linfonodos drenantes da lesão e realizar experimentos de indução do fenótipo susceptível por transferência de células do sistema imune. O TGF- β parece suprimir de forma determinante a resposta Th1, pois foi mostrado que camundongos BALB/c tratados com anticorpos anti-TGF- β , sensibilizados com antígeno e infectados com *L. amazonensis*, apresentam tamanhos de lesões menores e cargas parasitárias mais baixas do que animais do grupo controle (PINHEIRO et al., 2005).

Existem evidências de que antígenos com motivos repetitivos são melhores indutores de resposta imune humoral que antígenos sem esses motivos. Assim, uma grande proporção dos antígenos isolados de bibliotecas genéticas de *T. cruzi* por método baseado na reatividade dos mesmos com anticorpos do soro de indivíduos infectados apresenta motivos repetitivos. Esse fato pode ser explicado por uma elevada concentração de anticorpos contra esses antígenos no soro de pacientes chagásicos (SILVEIRA et al. 2001). Bhatia e colaboradores (1999) também relataram que muitos antígenos de *Leishmania* com motivos repetitivos, como os antígenos de *L. infantum* K 9 (cinesina 9) e K 26 (cinesina 26), são detectados por anticorpos de soro de pacientes com leishmaniose visceral causada por *L. infantum*. As cinesinas são da superfamília de proteínas motoras responsáveis pelo transporte

de moléculas por organelas ao longo dos microtúbulos e pela dinâmica dos cromossomos na mitose e meiose. Nesses processos, elas utilizam energia química da hidrólise do ATP gerando força. Essas proteínas são constituídas por duas cadeias pesadas idênticas, com aproximadamente 300 aminoácidos, e cadeias leves. As cadeias pesadas contém três domínios, um domínio motor globular N-terminal, um domínio central de α -hélice e um domínio globular C-terminal. As cadeias leves apresentam motivos repetitivos que variam de tamanho entre as espécies (KULL et al., 1996). Como a resposta imune protetora nas leishmanioses é de natureza Th1 (SCOTT et al., 1989), e foi demonstrado que o desenvolvimento deste tipo de resposta é inibido por respostas Th2 (PINHEIRO, 2004), antígenos com motivos repetitivos, que estimulariam fortemente a resposta humoral anti-*Leishmania*, de natureza Th2 (BURNS et al., 1993), poderiam potencialmente favorecer o desenvolvimento da infecção.

A injeção intradérmica de construções de cinesina recombinante de *L. infantum*, com motivos repetitivos, foi capaz de potencializar a infecção leishmaniótica, o que foi evidenciado pelo encontro de diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo salina, tanto em termos de tamanho da lesão quanto de carga parasitária. Por outro lado, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de camundongos que recebeu a construção sem motivos repetitivos e o grupo controle, não obstante 5 de 6 camundongos neste grupo apresentarem lesões maiores que 1,3 cm e todos os 6 apresentarem mais de 1.000.0000 parasitos por lesão, enquanto nenhum dos 5 camundongos do grupo controle apresentou lesão maior que 0,4 cm e apenas 1 dos 5 camundongos apresentou mais de 1.000.0000 parasitos por lesão (Fig. 19 e 20). Com esse resultado ficou evidenciado que a cinesina de *L. infantum*, além das proteínas contidas nas frações de *L. amazonensis*, também potencia a infecção no nosso modelo experimental, possivelmente em consequência a uma resposta imune Th2 mais exacerbada. Novos experimentos, com um número maior de camundongos por grupo, deveriam ser realizados para evidenciar possíveis diferenças nas atividades das cinesinas com e sem motivos repetitivos.

A injeção intradérmica de extrato de *L. braziliensis* também foi capaz de gerar suscetibilidade à infecção em camundongos BALB/c. Contudo, observou-se uma diferença em relação ao ELa, pois um aumento estatisticamente significativo do tamanho da lesão só foi observada com a menor concentração do ELb, enquanto

esse efeito foi observado com todas as concentrações do *ELa*. Foi, portanto, observada uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo dos animais que receberam 5 µg de *ELb* e o grupo de animais que receberam 186 µg, enquanto, o mesmo não foi observado com o *ELa*.

Uma possível explicação para essa variação dose-dependente da atividade do *ELb* adviria da possibilidade do *ELb* conter tanto moléculas que induzem preferencialmente uma resposta protetora quanto moléculas que induzem uma resposta imune favorável ao parasito, moléculas estas que ou teriam diferentes curvas de dose-resposta ou estariam em diferentes concentrações no *ELb*, e, portanto, exerceriam sua atividade imunológica mais intensamente em concentrações diferentes do extrato. Assim, as proteínas que potenciam a infecção estimulariam uma resposta imune Th2 ou de células reguladoras, não protetora, em quantidades menores do extrato, enquanto, em quantidades maiores, antígenos no *ELb* que induziriam uma resposta imune protetora seriam reconhecidos e o efeito desta resposta tenderia a prevalecer sobre o da resposta não protetora. Esta hipótese é passível de ser testada por experimentos (1) em que seria avaliado o efeito de uma pequena quantidade de *ELa*, que potenciaría a infecção isoladamente, misturada ou não com uma quantidade maior do *ELb*, e (2) utilizando frações purificadas do extrato de *ELb*, experimentos estes que poderiam resultar na obtenção de produtos de potencial importância na imunoproliferação da leishmaniose. Os resultados descritos acima não contradizem os de Silva e colaboradores (2011), que injetaram camundongos BALB/c com uma dose relativamente alta (200 µg de proteína) de *ELb*, quinzenalmente por via intravenosa, e os infectaram com *L. braziliensis* uma semana após a primeira injeção. Nesse experimento, o *ELb* promoveu um pequeno aumento da lesão somente até a segunda semana, havendo redução nas semanas subsequentes, e a carga parasitária manteve-se baixa, semelhante à do grupo controle, contrastando com o que foi observado com o *ELa*.

No experimento em que foram injetadas frações do *ELa* tratadas com inibidores de serina ou cisteína protease, os animais de todos os grupos tratados com o inibidor de serina protease desenvolveram lesões menores nas patas e tiveram carga parasitária mais baixa que os animais dos seus respectivos controles positivos, mostrando que esse inibidor consegue interferir com a atividade do *ELa*, e de todas as frações testadas, de forma generalizada. Esperava-se encontrar esse

efeito somente com a fração de 68 kDa, já que o peso molecular desta é compatível com o de uma serina protease descrita na literatura (LOPEZ e SIMONE, 2004).

Outros autores já tinham relatado um efeito de inibidores de serina protease na infecção leishmaniótica. Guedes e colaboradores (2010) mostraram que um extrato solúvel de *L. amazonensis* aos quais inibidores de serina ou cisteína proteases foram adicionados, quando injetado por via intramuscular em camundongos BALB/c que foram posteriormente infectados com *L. amazonensis*, resultou no desenvolvimento de lesões menores e redução da carga parasitária, acompanhado por diminuição da produção de TGF- β , IL-10 e TNF- α por células do linfonodo drenante da lesão. Em consonância com esses achados, foi observado aumento significativo da carga parasitária no grupo que recebeu uma serina protease purificada, associado a um aumento de IL-4, IL-10 e TGF- β em sobrenadantes de células do linfonodo drenante da lesão.

De forma similar, Silva e colaboradores (2011) verificaram que a adição de inibidores de serina protease ao ELa inibe a atividade promotora da infecção do mesmo quando injetado intravenosamente. Entretanto, um resultado inesperado e potencialmente importante do presente trabalho de dissertação foi que, não obstante os inibidores de serina protease terem inibido a atividade promotora do parasitismo das frações de 28 e 68 kDa, não foi identificada por espectrometria de massas qualquer serina protease nessas duas frações. Os inibidores de serina protease interferiram, portanto, na atividade potenciadora da infecção das frações de forma independente da presença de serina protease da *Leishmania* nessas frações. O mecanismo envolvido nessa atividade dos inibidores de serina protease não foi investigado neste trabalho de dissertação. É possível que os inibidores continuem presentes em concentrações efetivas mesmo uma semana após a sua injeção e após terem sofrido diluição em compartimentos aquosos *in vivo*, e possam portanto agir sobre as serina proteases dos parasitos que foram injetados uma semana depois. Apenas devido à difusão para o compartimento aquoso extracelular (não levando em conta, portanto, a possível adsorção a moléculas plasmáticas e teciduais e a difusão para o compartimento aquoso intracelular), as concentrações *in vivo* dos inibidores ficariam entre 45 e 50 μ M. Não está descrito na literatura se os inibidores agiriam nessas concentrações. Uma outra possibilidade é que os inibidores agiriam através da promoção de uma resposta imune Th1, com a consequente inibição de uma resposta imune Th2, e/ou pela inibição da produção de

citocinas reguladoras, por mecanismo ainda não descrito, como pode ser inferido do padrão de citocinas observado nos experimentos de Guedes e colaboradores mencionados acima (caso o efeito por eles encontrado dos inibidores de serina protease independa da ação sobre a serina protease de *Leishmania*). Em acordo com esta última hipótese, foi relatado na literatura que inibidores de serina protease estimulam a resposta Th1 em modelos experimental de alergia respiratória e neoplasia (ISHIZAKI et al., 2008; KIM et al., 2004).

Foram identificadas por espectrometria de massas 15 polipeptídeos diferentes na fração de 28 kDa, 18 na fração de 36 kDa, 17 na fração de 45 kDa e seis na fração de 68 kDa. Peptídeos da HSP70 foram identificados em todas essas quatro frações. Como a HSP70 de *Leishmania* tem um peso molecular de 71,8 kDa, a presença inesperada de peptídeos dessa proteína nas frações de 28, 36 e 45 kDa poderia ser explicada pela clivagem da proteína por proteases presentes no ELA do qual foram obtidas as frações. Como todas as quatro frações promoveram a infecção leishmaniótica, poder-se-ia pensar (em se aplicando a *Lex Parsimoniae*) que a HSP70 e fragmentos da mesma seriam responsáveis por esse efeito. Entretanto, Kaur, Sobti e Kaur (2011) observaram que camundongos BALB/c imunizados com gp63 na presença de HSP70 apresentam uma resposta Th1 aumentada, havendo redução da carga parasitária e das produções de IL-4 e IL-10 e aumento de IgG2a, IFN- γ e IL-2.

A HSP70, portanto, por estimular, de acordo com esses autores, uma resposta imune Th1, deveria exercer um papel protetor contra a infecção, e não promotor da mesma. Esta conclusão é reforçada pelos achados de Domínguez-Bernal e colaboradores (2012), que constataram que a imunização de camundongos com uma proteína recombinante contendo cinco polipeptídeos de *Leishmania* (H2A, H2B, H3, H4 e A2) e a HSP70 acarretou uma redução do tamanho da lesão, do número de parasitos nos linfonodos drenantes, e da produção de IL-4 por células do linfonodo drenante e da concentração IgG1 no soro desses animais, e aumentos da produção de óxido nítrico, IFN- γ e IL-17 por células do linfonodo drenante, e da proporção de anticorpos IgG2a/IgG1 anti-*Leishmania* no plasma. A presença da HSP70 na construção recombinante não promoveu, portanto, a infecção. Em aparente contradição com os achados acima, quando uma *L. infantum* nocaute para o gene da HSP70-II foi administrada pelas vias intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea em camundongos BALB/c, foram observadas concentrações elevadas

de NO no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoniais, aumento da atividade de anticorpo IgG2a anti-*Leishmania* no plasma e redução do tamanho da lesão (Carrión et al., 2011). Além disso, camundongos BALB SCID (CB-17^{scid}) imunodeficientes e hamsters infectados com a *L. infantum* mutante não desenvolveram qualquer sinal de patologia. Esse resultado demonstra que a expressão da HSP70 é importante para o estabelecimento e agravamento da leishmaniose, no entanto, não esclarece se o agravamento da doença seria decorrente de uma possível atividade imunomoduladora da HSP70, tendo em vista que os autores não compararam a cepa selvagem com a cepa mutante em relação à natureza da resposta imune por elas induzida.

Peptídeos da α e da β tubulina foram encontrados nas frações de proteínas com 28, 36 e 45 kDa, e da HSP83 nas frações de 28, 36 e 68 kDa. Bhowmich e Ali (2009) relataram que a β tubulina de *L. donovani*, incorporada em lipossomo, induziu uma redução da carga parasitária em camundongos BALB/c desafiados com o parasito. Este fato poderia indicar que a β tubulina de *Leishmania* não exerce atividade promotora da infecção, porém ela teria que ser testada sem ser incorporada a lipossomas para que isso ficasse claramente definido.

Foi mostrado que duas das proteínas identificadas na fração de peso aparente de 28 kDa, o fator-2 de alongamento (LeLF-2), estimulam a resposta Th1 (KUSHAWANA et al. 2013), e, portanto, provavelmente não estariam potenciando a infecção na fração. Mais detalhadamente, no trabalho referido acima mostrou-se que a LeIF-2 estimulou células mononucleares de sangue periférico de pacientes curados de leishmaniose visceral e de indivíduos expostos à infecção por *Leishmania* a produzirem as citocinas Th1 IL-12, IFN- γ e TNF- α (KUSHAWANA et al. 2013).

O LACK foi identificado na fração de 36 kDa por espectrometria de massas. Foi demonstrado que a resposta imune contra esta proteína de aproximadamente 36 kDa favorece a infecção de camundongos BALB/c por *L. donovani* (JULIA, RASSOULZADEGAN e GLAICHENHAUS, 1996). O LACK poderia, portanto, ser responsável pela atividade potenciadora da infecção da fração de 36 kDa.

A proteína dissulfeto isomerase (PDI) foi identificada na fração de peso molecular aparente de 45 kDa (tabela 3). Kushawaha e colaboradores (2012) relataram que uma PDI recombinante de *L. donovani* induziu a produção de IL-2 e IFN- γ e não de IL-10 por leucócitos periféricos de indivíduos residentes em área

endêmica de leishmaniose visceral antroponótica e em indivíduos curados dessa doença. A PDI parece, portanto, estimular uma resposta imune do tipo Th1, e não promoveria portanto a infecção.

Nenhuma das proteínas identificadas nas frações de 28, 45 e 68 kDa foi apontada até agora como possuindo uma atividade imunomoduladora capaz de favorecer a infecção leishmaniótica. Como foi mencionado acima, algumas das proteínas presentes nas frações puderam ser descartadas como prováveis candidatas a exercerem o efeito potenciador da infecção. Mesmo assim, sobriariam 11 polipeptídeos diferentes na fração de 28 kDa, 13 na fração de 36 kDa, 12 na fração de 45 kDa e quatro na fração de 68 kDa como possíveis candidatos a exercerem o efeito favorecedor da infecção. Para determinar a atividade potenciadora dessas proteínas, elas teriam que ser testadas individualmente, portanto após serem purificadas do ELa ou obtidas pela técnica do DNA recombinante.

Os resultados aqui expostos poderiam ser explicados por uma ou mais proteínas em cada uma das frações de 28, 45 e 68 kDa possuírem uma atividade imunomoduladora até agora não descrita, e pela presença do LACK na fração de 36 kDa. Uma outra hipótese para explicar a promoção da infecção seria que essa promoção decorreria do protocolo utilizado, e não de uma propriedade intrínseca das proteínas injetadas. Essa hipótese implicaria em que qualquer proteína de *Leishmania*, quando injetada intradermicamente em baixa dose, potencializaria a infecção. Apesar de ter sido descrito por alguns autores que a injeção subcutânea, e não a intravenosa (BHOWMICK, MAZUMDAR e ALI, 2009) e a epidérmica (WEISS et al., 2007), de extrato de *Leishmania* potencia a infecção, efeito semelhante da injeção intradérmica de antígenos não foi relatado. Pelo contrário, foi descrito que células dendríticas da derme de camundongos resistentes à infecção por *L. major* e inoculados com esse parasito migram para os linfonodos transportando antígenos parasitários e lá induzem a proliferação de linfócitos T (MAYEROVA et al., 2004), dando início a uma resposta imune protetora. Se isso for verdadeiro, a introdução de antígenos no compartimento dérmico por si só não deveria favorecer a infecção, e esse favorecimento dependeria, portanto, da natureza do antígeno. Um outro achado que pode ser usado como evidência contra a hipótese de que a introdução de qualquer antígeno no compartimento dérmico leva ao favorecimento da infecção é que esse favorecimento foi muito menos intenso quando 186 µg de ELb foram introduzidos em comparação com o observado com 186 µg de ELa. Em nossos

experimentos, todas as preparações potencialmente antigênicas injetadas intradermicamente potenciaram a infecção. Nenhuma outra proteína além da HSP70 teve seus peptídeos identificados em todas as quatro frações analisadas por espectrometria de massas. Como a HSP70, pela razão exposta acima, foi considerada uma improvável candidata a promover a infecção, e peptídeos da α tubulina e da HSP83 foram encontrados em três frações diferentes, um mínimo de duas proteínas distintas teria que estar envolvido na atividade promotora da infecção das quatro frações. Dessa forma, baseado nos resultados descritos nesta dissertação, pelo menos três proteínas diferentes seriam capazes de potencializar a infecção quando injetadas intradermicamente (duas proteínas ainda por identificar nas frações de ELa e a cinesina de *L. infantum*). Esse número talvez seja pequeno para justificar a afirmação que qualquer proteína de *L. amazonensis*, quando injetada intradermicamente, favorece a infecção. Para discriminar as duas hipóteses mencionadas acima, seria importante determinar, portanto, o efeito, sobre uma subsequente infecção leishmaniótica, da injeção intradérmica de outros antígenos além dos utilizados neste trabalho de dissertação.

9.CONCLUSÕES

- Frações do extrato de amastigotas de *L. amazonensis* (28, 36, 45 e 68 kDa), quando injetadas por via intradérmica, potenciaram a infecção de *L. braziliensis* em camundongos BALB/c, sugerindo que mais de uma proteína diferente é capaz de exercer uma atividade favorável à disseminação do parasito.
- O extrato de amastigota de *L. braziliensis* (ELb) só foi capaz de potenciar a infecção por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c, quando administrado por via intradérmica, na dose de 5 µg, sugerindo que, em doses maiores daquele extrato, moléculas da *Leishmania* estimulam uma resposta imune protetora, diferindo do que ocorre com o extrato de amastigotas de *L. amazonensis*.
- Apesar de ter sido demonstrado que a injeção intradérmica de uma construção de cinesina recombinante de *L. infantum*, com motivos repetitivos, é capaz de potenciar a infecção em camundongos BALB/c por *L. braziliensis*, um número maior de camundongos deve ser tratado com as construções com e sem motivos repetitivos para determinar possível diferença entre elas em relação ao seu efeito biológico.
- Como existem dados na literatura indicando que a HSP70, cujos peptídeos foram identificados nas frações de 28, 36, 45, 68 kDa, exerceria uma atividade protetora contra a infecção, um mínimo de duas proteínas diferentes de *L. amazonensis* teriam que possuir atividade promotora da infecção de acordo com os resultados da espectrometria de massas, proteínas estas às quais ainda não foram atribuídas uma atividade imunomodularora.
- Os inibidores de serina protease foram capazes de interferir sobre a atividade promotora da infecção das frações de 28 e 68 kDa, as quais não continham serina proteases, sugerindo que estes inibidores ou (1) agiriam sobre as serina proteases dos parasitos, inoculados uma semana após, mesmo estando em concentrações iguais a, ou menores que, 50 µM (concentração esta que seria a maior possível após diluição *in vivo*) ou (2) estariam desviando uma resposta imune não protetora para uma resposta protetora.

10.PERSPECTIVAS

- Testar um número maior de frações do extrato de *L. amazonensis*, diferentes das já testadas, e submetidas a purificação adicional, e/ou outras proteínas recombinantes, no modelo experimental aqui descrito, a fim de acumular ou não evidências de que qualquer molécula de *L. amazonensis*, se injetada intradermicamente, potencia a infecção
- Investigar o mecanismo dessa potenciação, particularmente no que toca a uma possível produção aumentada de TGF- β .
- Identificar moléculas presentes no extrato de *L. braziliensis* que estejam relacionadas com a redução do efeito potenciador da infecção leishmaniotica pela injeção intradérmica do extrato.
- Investigar possível atividade imunomoduladora dos inibidores da serina proteases, usando como imunógeno antígenos de *Leishmania* sem esta atividade enzimática, na presença ou ausência dos inibidores, em modelo murino de suscetibilidade à infecção leishmaniótica.

REFERÊNCIA

- ABDILLE, H.M.; LI, Y.S.; DING, J.; SUO, X. Trypanosoma evansi: Paraflagellar rod protein 1 and 2 are similar but lack common B cell epitopes. **Experimental Parasitology**. vol.120, p. 411-416, 2008.
- AFONSO, L. C. C.; SCOTT, P. Immune Responses Associated with Susceptibility of C57BL/10 Mice to *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**. vol.6, p.2952-2959, 1993.
- AGALLOU, M.; MARGARONI, M.; KARAGOUNI, E. Cellular vaccination with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a peptide of *Leishmania infantum* KMP-11 and CpG oligonucleotides induces protection in a murine model of visceral leishmaniasis. **Vaccine**. n.29, p.5053-5064, 2011.
- BHATIA, A.; DAIFALLA, N.S.; JEN, S.; BADARO, R.; REED, S.T.; SKEIKY, YAW. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 e K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. vol.102, p.249-261, 1999.
- BHOWMICK, S.; ALI, N. Identification of Novel *Leishmania donovani* Antigens that Help Define Correlates of Vaccine-Mediated Protection in Visceral Leishmaniasis. **Plos One**, vol. 4, junho, 2009.
- BHOWMICK, S.; MAZUMDAR, T.; ALI, N. Vaccination route that induces transforming growth factor β production fails to elicit protective immunity against *Leishmania donovani* infection. **Infection and immunity**. n.4, vol.77, p. 1514-1523, 2009.
- BURNS JM, JR., SHREFFLER WG, BENSON DR, GHALIB HW, BADARO R, REED SG., Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy Sciences**. vol. 90, p.775-779, 1993.
- CALDAS, M.JA.; SILVA, C.R.D; PEREIRA, R.C.C.; NUNES, S.M.P.; SILVA, P.B.; SILVA, M.A.A.; BARRAL, A.; COSTA, L.M. J. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection on childhood from endemic area of visceral leishmaniasis in the São Luís - MA, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. n.34, vol.5, p. 445-451, set-out, 2001.
- CARVALHO, P.L.; PASSOS, T.S.; JESUS, R.A. Immuno pathogenesis of Tegumentary Leishmaniasis. **Gazeta Médica da Bahia**. n.75, vol.1(Jan-Jun), p.57-65, 2005.
- CARRIÓN, J. Mechanisms of immunity to *Leishmania* major infection in mice: The contribution of DNA vaccines coding for two novel sets of histones (H2A–H2B or H3–H4). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. vol.34, p.381-386, 2011.

CARRIÓN, J.; FOLGUEIRA, C.; SOTO, M. FRESNO, M.; REQUENA, J.M. *Leishmania infantum* HSP70-II null mutant as candidate vaccine against leishmaniasis: a preliminary evaluation. **Parasites e vectors**. n.4, vol.150, p.2-10, 2011.

CARRILLO, E.; CRUSAT, M.; NIETO, J.; CHICHARRO, C.; THOMAS, C.M.; MARTÍNEZ, E.; VALLADARES, B.; CAÑAVATE, C.; REQUENA, M.J.; LÓPEZ, M.C.; ALVAR, J.; MORENO, J. Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**. vol.26, p. 1902-1911, 2008.

CHATELAIN, R.; MAUZE, S.; COFFMAN, R. Experimental *Leishmania major* infection in mice: role of IL-10. **Parasite Immunology**. vol. 21, p. 211–218, 1999.

CHANG, K.; MCGWIRE, B.S. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. **Kinetoplastid Biology and Disease**. vol.1, p.1, 2002.

CHILDS, G.E.; LIGHTNER, L.K.; MCKINNEY, L.; GROVES, M.G.; PRICE, E.E.; HENDRICKS, L.D. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. vol.78, p.25-34, 1984.

CHOUDHURY, R.; BHAUMIK, K.S.; DE, T.; CHAKRABORTI, T. Identification, purification, and characterization of a secretory serine protease in an Indian strain of *Leishmania donovani*. **Molecular and Cellular Biochemistry**. vol.320, p.1-14, 2009.

CHOUDHURY, R.; DAS, P.; BHAUMIK, K.S.; DE, T.; CHAKRABORTI, T. *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**. vol.17, n.4, p. 660-667, 2010.

DEKREY, G. K.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Analysis of the Immune Responses of Mice to Infection with *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**. vol.66, p.827-829, 1998.

DELGADO, O.; CUPOLILLO, E.; GARRIDO, F.B.; SILVIA, S.; BELFORD, E.; GRIMALDI, G.; MOMEN, H.; Cutaneous Leishmaniasis in Venezuela Caused by Infection with a New Hybrid between *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. n.5, vol.92, p.581-582, 1997.

DOMINGUEZ-BERBAL, G.; HORCAJO, P.; ORDEN, J.A.; De La FUENTE, R.; HERRERO-GIL, A.; ORDÉNEZ- GUITIÉRREZ, L.; CARRIÓN, J. Mitigating an undesirable immune response of inherent susceptibility to cutaneous leishmaniasis in a mouse model: the role of the pathoantigenic HISA70 DNA vaccine. **Veterinary Research**. vol.43, p.3-11, 2012.

DORES-SILVA, R.P.; SILVA, R.E.; GOMES, R.E.F.; SILVA, P.K.; BARBOSA, S.R.L.; BORGES, C.J. Low resolution structural characterization of the Hsp70 interacting

protein – Hip – from *Leishmania braziliensis* emphasizes its high asymmetry. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. vol.520, p.88-98, 2012.

DORVAL, C.M.E.M.; OSHIRO, T.E.; CUPOLLILO, E.; OSHIRO, T.E.; de CASTRO, C.C.A.; ALVES, P.T. Occurrence of American tegumentary leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State associated to the infection for *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. n.39, vol.1, p43-46, 2006.

GUEDES, H.L.M.; PINHEIRO, O.R.; CHAVES, P.S.; De SIMONE, G.S.; BERGMANN, R.B. Serine proteases of *Leishmania amazonensis* as immunomodulatory and disease-aggravating components of the crude LaAg vaccine. **Vaccine**. vol.28, p.5491-5496, 2010.

GUMY, A., LOUIS, J.A.; LAUNOIS, P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. **International Journal for Parasitology**. vol.34, p.433-444, 2004.

HOWARD, J.G.; HALE, C.; CHAN-LIEW, W.L. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. Immunogenetic aspects of a susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. **Parasite Immunology**. vol.2, p.303-314, 1980.

HUGENTOBLE, R. F.; YAM, K.K.; GILLARD, J.; MAHBUBA, R.; OLIVIER, M.; COUSINEAU, B. Immunization against *Leishmania major* Infection Using LACK- and IL-12-Expressing *Lactococcus lactis* Induces Delay in Footpad Swelling. **Plos One**. vol.7, 2012.

ISHIZAKI, M.; TANAKA, H.; KAJIWANA, D.; TOYOHARA, T.; WAKAHARA, N.I.; NAGAI, H. Nafamostat mesilate, a potent serine protease inhibitor, inhibits airway eosinophilic inflammation and airway epithelial remodeling in a murine model of allergic asthma. **Journal of Pharmacological Sciences**. vol.108, p.355-363, 2008.

JONES, D.E.; ACKERMANN, M.R.; WILLE, U.; HUNTER, C.A.; SCOTT, F. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. **Infection and immunity**. n.4, vol.70, p. 2151-2158, 2002.

JULIA, V.; RASSOULZADEGAN, M.; GLAICHENHAUS, N. Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. **Science**. n. 5286, vol. 274, p. 421-423, 1996.

KAUR, T.; SOBTI, R.C.; KAUR, S. Cocktail of gp63 and Hsp70 induces protection against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. **Parasite immunology**. n.2, vol.33, p. 95-103, 2011.

KIM, T.W.; HUNG, C.F.; BOYD, D.A.K.; HE, L.; LIN, C.T.; KAISERMAN, D.; BIRD, P.I.; WU, T.C. Enhancement of DNA vaccine potency by coadministration of a tumor antigen gene and DNA encoding serine protease inhibitor-6. **Cancer Research**. vol.64, p.400-405, 2004.

KULL, F.J.; SABLIN, E.P.; LAU, R.; FLETTERICK, R.J.; VALE, R.D. Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. **Nature**. vol.380, p.550-555, 1996.

KUSHAWANA, P.K.; GUPTA, R.; TRIPATHI, C.D.P.; SUDAR, S.; DUBE, A. Evaluation of *Leishmania donovani* protein disulfide isomerase as a potential immunogenic protein/vaccine candidate against visceral leishmaniasis. **Plos one**. n.4, vol.7, p. 1-14, 2012.

KUSHAWANA, P.K.; GUPTA, R.; SAHASRABUDDHE, A.A.; SUDAR, S.; DUBE, A. Elongation Factor-2, a Th1 stimulatory protein of *Leishmania donovani*, generates strong IFN-g and IL-12 response in cured *Leishmania* Infected patients/ hamsters and protects hamsters against *Leishmania* challenge. **The Journal of Immunology**. vol.20, p. 6416-6427, 2013.

LACERDA, I.D.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; NUNES, P.M.; DE-LUCA, P.M.; GENESTRA, S.M; LEON, P.L.L.; PINHO, B.M.; LIMA, M.L.; MATOS, S.C.D.; MEDEIROS, A.M.; SERGIO MENDONÇA, F.C. Kinetoplastid membrane protein-11 exacerbates infection with *Leishmania amazonensis* in murine macrophages. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**.n.2, vol.107, p.238-245, 2012.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. vol, 227, p.680–685, 1970.

LANGE, U.G.; MASTROENI, P.; BLACKWELL, J.M.; STOBBER, C.B. DNA-*Salmonella* enterica serovar *Typhimurium* primer-booster vaccination biases towards T helper 1 responses and enhances protection against *Leishmania major* infection in mice. **Infection Immunity**. vol.72, p.4924–4928, 2004.

LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**. N.5, vol.77, p.569-596, 1983.

LAINSON, R. S., J.J. Evolution, classification and geographical distribution. The leishmanioses in biology and medicine. K.-K. Peters W., K. London, **Academic Press**. n.1, p.1-118, 1987.

LIMA HC, BLEYENBERG JA, TITUS RG. A Simple Method for Quantifying *Leishmania* in Tissues of Infected Animals. **Parasitology Today** . vol.13, p.80-82, 1997.

LOCKESLEY, R.; LOIS, J.A. Immunology of leishmaniasis. **Current Opinion in Immunology**, V.4, p.413-418,1992.

LÓPEZ, R.E.S.; SANTOS, T.R.; DIAZ, J.A .M.; TANAKA, M.N.; Simone, S.G. Serine protease activities in *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* promastigotes. **Parasitology Research**, 107, p.1151–1162, 2010.

LOPES, S. E.R.; SIMONE, D. G.S. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: purification and characterization of a promastigote serine protease. **Experimental parasitology**.107, p. 173-182, 2004.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. **The Journal Biological Chemistry**. vol.193,p. 265–276, 1951.

MAGALHÃES, V.P.; MARTINS-FILHO, O.A.; PRATA, A.; SILVA, L.S.; RABELLO, A.; CARVALHO, A.T.; FIGUEIREDO, R.M.; CARVALHO, S.F.; FERRARI, T.C.A.; WEYENBERGH, J.V.; OLIVEIRA, R.C. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon- γ and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor- α + monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. **Clinical and Experimental Immunology**. vol.146, p.124-132, 2006.

MALAFAY, G. Captação de ferro pelos parasitos do gênero *Leishmania*. **Revista de Biociências**. UNITAU, v. 14, n.1, 2008. Disponível em periodicos.unitau.br

MAYEROVA, D.; PARKE, E.A.; BURSCH, L.S.; ODUMADE, O.A.; HOGQUIST, K.A. Langerhans cells activate naive self-antigen-specific CD8 T cells in the steady state. **Immunity**. n.3, vol.21, p.391-400, 2004.

MATTHEWS, D.J.; EMSON, CL; MCKENZIE, G.J.; JOLIN, H.E.; BLACKWELL, J.M.; MCKENZIE, A.N. IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. **The Journal Immunology**. vol164, p.1458-1462, 2000.

MATOS, D.C.S.; FACCIOLI, L.A .P.; FINKELSTEN, L.C.; De LUCA, P.M.; REAL, S.C.; ARMÔA, G.R.G; LEMES, E.M.B; RICARDO, D.D.; MENDONÇA, S.C.F. Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of *Leishmaniaamazonensis* and its surface expression increases during metacyclogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105 n.3 p.341-347, 2010.

McDONALD, M.H.; MORRISON, C.J.; McMASTER, W.R. Analysis of the active site and activation mechanism of the *Leishmania* surface metalloproteinase GP63. **Biochemical and Biophysical Acta**. vol,1253, p.199-207, 1995.

MOTTRAN, J.C. Evidence from disruption of the *Imcpb* gene array of *Leishmaniamexicana* that cysteine protease are virulence factors. **Proceedings of the National. Academy of Sciences**. vol.93 p.6008-6013, 1996.

MURRAY, H.W.; STERN, J.J.; WELTE, K.; RUBIN, B.Y.; CARRIERO, S.M.; NATHAN, C.F. Experimental visceral leishmaniasis: production of interleukin 2 and interferon-gamma, tissue immune reaction, and response to treatment with interleukin 2 and interferon-gamma. **The Journal Immunology**. vol.138, p. 2290-2297, 1987.

PEARSON, D.; STEIGBIGEL, R.T. Phagocytosis and killing of human serum upon *Leishmania donovani*. **The Journal of immunology**, vol. 125, p. 2195 – 2201, 1983.

POCAI, E.A.; FROZZA, L.; HEADLEYS.A.; GRAÇA, D.L. Leishmaniose visceral (calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**. n.3, vol.28, p.501-505, 1998.

PINHEIRO, R.O.; PINTO, E.F.; LOPES, J.R.C.; GUEDES, H.L.M.; FERTANES, F.R.; ROSSI – BERGMANN, B. TGF-b-associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. **Microbes and Infection**. vol.7, p. 1317-1323, 2005.

PINHEIRO, C.G.M. **Avaliação da resposta imune em camundongos utilizando diferentes protocolos de imunização com antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi***. 2011. 172 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ.

PINHEIRO, R.O. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma**. n.7-8, vol.16, p.79-82, 2004.

RAMÍREZ, A.C.; REQUENA, M.J.; PUERTA, J.C. Identification of the HSP70-II gene in *Leishmania braziliensis* HSP70 locus: genomic organization and UTRs characterization. **Parasites e Vectors**. vol.4, p. 166, 2011.

ROGERS, K.A.; DEKREY, G.K.; MBOW, M.L.; GILLESPIE, R.D.; BRODSKYN, C.I.; TITUS, R.G. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiology Letters**. vol.209, p.1-7, 2002.

RUSSELL, D.G.; ALEXANDER J. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. **The Journal of Immunology**. n. 8, vol.140, p.1274-1279, 1988.

SAFFARI, B.; MOHABATKAR, H. Computational Analysis of Cysteine Proteases (Clan CA, Family C1) of *Leishmania major* to Find Potential Epitopic Regions. **Genomics Proteomics Bioinformatics**. n. 3, vol.7, 2009.

SANTRICH, C.; MOORE, L.; SHERWIN, T.; BASTIN, P.; BRONKAW, C.; KULL, K.; LeBOWINTZ, H.J. A motility function for the paraflagellar rod of *Leishmania* parasites revealed by *PFR-2* gene knockouts. **Molecular and Biochemical Parasitology**. vol.90, p. 95-109, 1997.

SCOTT P.A.; FARRELL J.P. Experimental cutaneous leishmaniasis: disseminated leishmaniasis in genetically susceptible and resistant mice. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**. vol.31, p. 230-238, 1982.

SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R.L.; PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **Journal of Experimental Medicine**. vol.168, p.1675-1684, 1988.

SCOTT, P.; PEARCE, E.; CHEEVER, A.W.; COFFMAN, R.L.; SHER, A. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. **Immunology Review**. vol.112, p.161-182, 1989.

SILVA, V.M.G.; LARANGEIRA, D.F.; OLIVEIRA, P.R.S.; SAMPAIO R.B.; SUZART P.; Biointervention Student Group, NIHEI, J.; TEIXEIRA, M.C.A.; MENGEL, J.O.; Dos SANTOS, W.L.C.; PONTES-de-CARVALHO, L. Enhancement of experimental cutaneous leishmaniasis by *leishmania* molecules with serine protease activity. I. Requirement of IL-4. **Infection and Immunity**. n.3, vol.79, p.1236-1243, 2011.

SILVA – LÓPEZ, R.E. Proteases de *Leishmania*: Novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química nova**. N.7, vol.33, p.1541-1548, 2010.

SILVEIRA, J.F.; UMEZAWA, E.S.; LUQUETTI, A.O. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. **Trends in Parasitology**. n.6, vol.17, p. 286-291, 2001.

SOUSSI, N.; SAKLANI-JUSFORGUES, H.; COLLE, J.H.; MILON, G.; GLAICHENHAUS, N. Effect of intragastric and intraperitoneal immunisation with attenuated and wild-type LACK expressing *Listeria monocytogenes* on control of murine *Leishmania major* infection. **Vaccine**. vol.20, p.2702–2712, 2002.

TABATABAEE, P. A.; ABOLHASSANI, M.; MAHDAVI, M.; NAHREVANIAN, H.; AZADMANESH, K. *Leishmania major*: Secreted antigens of *Leishmania major* promastigotes shift the immune response of the C57BL/6 mice toward Th2 in vitro. **Experimental Parasitology**, 2011.

TAVARES, N.M.; SANTOS, D.M.; OLIVEIRA, C.I.; BRODSKY, N. Vaccination strategies against visceral and cutaneous leishmaniasis: lessons from the experimental models. **Gazeta Médica da Bahia**. Suppl. 3, vol.79, p.110-121, 2009.

TEIXEIRA, MC, DE JESUS SR, SAMPAIO RB, PONTES De CARVALHO LC, Dos SANTOS WC. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. **Parasitology**. vol, 88, p.963 – 968, 2002.

XU, D.; CHAN, W.L.; LEUNG, B.P.; HUNTER, D.; SCHULZ, K.; CARTER, R.W.; MCINNES, I.B.; ROBINSON, J.H.; LIEW, F.Y. (1998). Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. **Journal Experimental Medicine**. vol.188, p.1485-1492, 1998.

YAO, C.; DONELSON, J.E.; WILSON, M.E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Molecular Biomechanical Parasitology**. vol.132, p.1-16, 2003.

WEI, X.Q.; LEUNG, B.P.; NIEDBALA, W.; PIEDRAFITA, D.; FENG, G.J.; SWEET, M.; DOBBIE, L.; SMITH, A.J.; LIEW, F.Y. (1999). Altered immune response and susceptibility to *Leishmania major* and *Staphylococcus aureus* infection in IL-18-deficient mice. **Journal of Immunology**. vol.163, p.2821-2828, 1999.

WEISS, R.; SCHEIBLHOFER, S.; THALHAMER, J.; BICKERT, T.; RICHARDT, U.; FLEISCHER, B.; RITTER, U. Epidermal inoculation of *Leishmania*-antigen by gold bombardment results in a chronic form of leishmaniasis. **Vaccine**. vol. 25, p.25-33, 2007.

Intradermally injected *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* aqueous extracts differ in a dose-dependent way in their enhancing effect on *Leishmania* infection

Cintia F de Araújo¹, Virgínia MG Silva², Andre C Andrade¹, Luciana S Aragão-França¹, Viviane CJ Rocha¹, Priscila SL Santos¹, Lain C Pontes de Carvalho^{1§}

¹Gonçalo Moniz Research Centre, Oswaldo Cruz Foundation, Rua Waldemar Falcão 121, Salvador, Brazil

² State University of Southwest Bahia, Rua José Moreira Sobrinho, Jequié, Brazil

[§]Corresponding author

Email addresses:

CFA: ciuaraujo@hotmail.com

VMGS: vmgoesbr@yahoo.com.br

ACA: andrecroandrade@gmail.com

LSAF: luaragao@gmail.com

VCJR: vivvi_junqueira@yahoo.com.br

PSLS: prys_bbs@hotmail.com

LCPC: lain.carvalho@gmail.com

Abstract

Background

It has been reported that repeated intravenous injections of a relatively large amount of *Leishmania amazonensis* amastigote extract (*LaE*) in BALB/c mice exacerbates the infection of these mice by *Leishmania braziliensis*. However, the large amount of the extract required to induce the phenomenon hinders the carrying out of experiments aimed at identifying the active molecule(s) through extract purification. In the present work, a dose-response experiment was done to find out if smaller amounts of *LaE* would reproduce the phenomenon when injected by the intradermal route. In addition, it was also investigated whether a *Leishmania braziliensis* amastigote extract (*LbE*) would exert the same effect and whether the effect would occur in C57Bl/6 mice.

Results

It was found that a single injection of either *LaE* or *LbE* in a two orders of magnitude lower dose was capable of inducing the phenomenon only in BALB/c, and not in C57Bl/6, mice. In addition, it was observed that a higher dose of *LbE* failed to enhance the infection.

Conclusions

Those results indicate the possible existence in *LbE*, and not in *LaE*, of molecules that interfere with the extract infection-enhancing activity when it is injected in larger amounts.

Keywords

Leishmania amazonensis, *Leishmania braziliensis*, intradermal antigen, infection enhancement, leishmaniasis

Background

Leishmaniasis are zoonosis caused by different species of protozoa of the genus *Leishmania*. In Brazil, *Leishmania braziliensis* is the most prevalent etiologic agent in the northeast region and *Leishmania amazonensis* is the most widely distributed species [7, 3]. Both species can cause American cutaneous leishmaniasis (ACL), which is in geographic expansion in Brazil, with the incidence increasing from 10.5/100,000 inhabitants in 1985 to 18.6/100,000 inhabitants in 2005. The disease has currently been reported in all regions of the country, but, with an average of 28,568 annual cases, the northeastern region, one of the two poorest of the country, had the highest incidences between 1985 and 2005. In 2001, for example, the incidence in that region was 93.8 cases/100,000 inhabitants [4].

ACL has four distinct clinical manifestations: cutaneous, mucosal, disseminated cutaneous, and diffuse cutaneous. Cutaneous, mucosal, and disseminated leishmaniasis are caused in Brazil mainly by *L. braziliensis*, while *L. amazonensis*, in addition to cutaneous leishmaniasis, causes, in a minority of cases, diffuse cutaneous leishmaniasis [5].

BALB/c mice are partially resistant to infection with *L. braziliensis*: they do not develop severe injuries and more often than not cure the infection with a mixed cellular immune response [13]. On the other hand, when infected by *L. major* and *L. amazonensis*, they develop a Th2 cell response and progressive, necrotic skin lesions, and eventually die of the disease [13]. The susceptibility to the leishmanial infection depends not only on the *Leishmania* species, but also on the genetic makeup of the mouse. Thus, C57Bl/6 and CBA mice, as the BALB/c, are resistant to *L. braziliensis* and susceptible to *L. amazonensis* [13], but, contrasting with the BALB/c, they are resistant to *L. major* [11]. The outcome of the infection of BALB/c mice by *L. braziliensis*, however, can be completely changed by treating them with four biweek intravenous injections of *L. amazonensis* extract (*LaE*) containing 200 µg of protein and starting one week before the infection: the animals thus treated become fully susceptible to the disease. On the other hand, this phenomenon did not take place when a *L. braziliensis* extract (*LbE*) was substituted for the *LaE* [12], or when lower amounts of *LaE* were used (unpublished). In order to identify the active principle of the extract through its purification, it would be important to find out whether the infection-enhancing phenomenon could be observed with lower amounts of the extract if it was injected by another route. The aim of the present study was to investigate whether lower doses of *LaE* could modulate the *L. braziliensis* infection in BALB/c and C57Bl/6 mice when injected by the intradermal route and whether this effect could be observed with *LbE*. It was found that a single injection of either *LaE* or *LbE* in a dose two orders of magnitude lower than that needed intravenously induced the phenomenon in BALB/c, but not in C57Bl/6, mice. In addition, it was observed that a higher dose of *LbE* failed to enhance the infection.

Results

Effect of the intradermal injection of *LaE* on *L. braziliensis* infection in BALB/c mice

A single intradermal injection of *LaE*, containing amounts of protein varying from 1.25 to 20 µg, led to significant increases in the sizes of the lesions caused by *L. braziliensis* and in the number of parasites in the lesions (Figure 1).

Dose-response curves of *LbE* and *LaE* intradermal injections in *L. braziliensis*-infected BALB/c mice

The injection of *LbE* containing 5 µg of protein led to the development of significantly larger lesions in BALB/c mice than the injection of *LbE* containing 186 µg of protein or than the injection of the vehicle (Figure 2). Contrasting with this, no statistically significant difference was observed among the groups of mice injected with the different doses of *LaE* (Figure 2). Moreover, all doses of *LaE* led to similar increases in tissue parasitism (Figure 3). Although all doses of *LbE* also increased tissue parasitism, a larger proportion of the mice that received the lowest amount of *LbE* had more than 1 million parasites per lesion (8 out of 8 mice) than the mice that received the highest amount (2 out of 8 mice). In fact, 6 out of 8 mice that received *LbE* containing 186 µg of protein had less than 14,000 parasites per lesion ($p = 0.007$, Fisher's exact probability test). However, the difference between this and the others groups of mice that received *LbE* was not statistically significant using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test (Figure 3).

Effect of the intradermal injection of *LaE* or *LbE* on *L. braziliensis* infection in C57Bl/6 mice

Neither the intradermal injection of *LaE* nor of *LbE* exacerbated the cutaneous disease caused by *L. braziliensis* in C57Bl/6 mice (Figure 4).

Discussion

As has been shown for the intravenous injection of *LaE*, its intradermal injection in BALB/c mice, and not in C57Bl/6 mice, also potentiated the infection by *L. braziliensis*. However, when administered by the intradermal route, a dose of *LaE* two orders of magnitude lower (1.25 mg) than the dose that was able to promote the infection by the intravenous route (200.00 µg; [12]) sufficed to produce the effect. So far, although differences in *Leishmania* infection outcomes depending on antigen being injected either by the subcutaneous, epidermal, intramuscular, intraperitoneal or intravenous routes have been shown [1, 2, 6, 15], to the best of the authors' knowledge no comparisons between immunizations with *Leishmania* antigens by the intravenous and the intradermal routes have been reported in the literature.

When injected intravenously, the enhancing effect on the infection of *Leishmania* extracts depends on the presence of IL-4 [12]. The mechanism of this enhancement when the antigen is injected in the intradermal space has still to be clarified. Preliminary experiments showed no differences in the production of either IL-4 or IL-10 by anti-CD3 - stimulated cells of lesion-draining lymph nodes (unpublished). The possibility that the effect could be mediated by TGF-β- producing Treg cells is open to investigation. Supporting this hypothesis, it has been reported that TGF-β exacerbates the infection of BALB/c mice by *L. amazonensis* [10]. If the most likely underlying mechanism, i. e., the biasing of the BALB/c mouse immune response towards an infection-permissive one by antigens in the *LaE* is true, the C57Bl/6 immune system would respond to these antigens in a different way.

It was also demonstrated in the present work that the injection of *LbE* by the intradermal route potentiates the infection by *L. braziliensis*. However, contrasting to what was observed with *LaE*, this effect was more prominent with a lower dose of the extract than with the larger doses. This finding is consistent with that reported by Silva and collaborators [12], who found that *LbE*, when repeatedly administered by the intravenous route in a relatively high dose, did not exacerbate the infection of BALB/c mice by *L. braziliensis*. This dose-dependent difference between *LaE* and *LbE* in affecting the course of the disease could be ascribed to the coexistence in *LbE* of molecules that could induce protective immune responses and of others that could induce a permissive immune response, which would have different dose of extract-response curves. Thus, antigens that could induce a protective immune response would be recognized by the immune system only when high amounts of *LbE* was introduced in the organism (and identical or similar antigens would not be present or be present in an insufficient amount in the *LaE*), whereas in low amounts of *LbE* others antigens, which could be present in higher concentrations in the extract, would induce an infection susceptibility-associated immune response. This hypothesis is amenable to investigation, e.g. through experiments using *LbE* fractions and/or by testing the effect of mixtures of low amounts of *LaE* with high amounts of *LbE*.

The fact that a high amount of *LbE* is less active in terms of inducing disease exacerbation than lower amounts of the same extract and than the same high amount of *LaE* can be used as evidence against the hypothesis that the simple introduction of any *Leishmania* antigen in the intradermal compartment would aggravate the disease.

Conclusions

In conclusion, it was demonstrated in the present work that a few micrograms of *LaE* or *LbE*, when injected intradermally, are capable of aggravating the cutaneous disease caused by *L. braziliensis*, and that this phenomenon is not seen with a larger amount of *LbE*, indicating that the two *Leishmania* species may differ in terms of the presence or of the relative amounts of antigens against which the BALB/c immune system would mount a protective immune response. Whether this difference would account for the fact that a minority of human beings with cutaneous lesions caused by *L. amazonensis* develops a progressive disease, a phenomenon that does not occur when the cutaneous lesions are caused by *L. braziliensis*, is open to speculation. The progressive disease would be accounted by *L. amazonensis* parasites producing only or mainly infection-promoting molecules, whose recognition as such would also depend on the genetic make up of the host. It is tempting to make a parallel between the fact that only the BALB/c, and not the C57Bl/6 mice, had their disease worsened by *Leishmania* extracts and the fact that only a minority of human beings with clinically manifested *L. amazonensis* infection develop the diffuse, progressive disease.

Methods

Mice and ethical considerations

Specific-pathogen-free, 8 to 12 week-old BALB/c and C57Bl/6 mice were maintained at the animal facilities of the Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Brazil, and were provided with rodent diet and water *ad libitum*. All procedures were approved and conducted according to the institutional Committee for Animal Care and Utilization.

Parasites and parasite extracts

L. amazonensis (MHOM/Br87/Ba125) and *L. braziliensis* (MHOM/Br/3456) strains were used. Their infectivities were maintained by regular inoculations of promastigotes into susceptible BALB/c mice and golden hamsters, respectively. Promastigotes, derived from tissue amastigotes, were cultured at 23° C in Schneider's medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), pH 7.2, supplemented with 50 µg/mL of gentamicin and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco Laboratories, Grand Island, NY) for *L. amazonensis* or 20% FBS for *L. braziliensis*. *L. amazonensis* and *L. braziliensis* axenic amastigotes were obtained by the differentiation of promastigotes in axenic cultures, as described elsewhere [14]. The amastigotes were washed three times in ice cold sterile saline, resuspended in saline, and lysed by exposure to ultrasound (10 1-minute, 300-W pulses, with 30-second intervals in between, on ice; Sonifier Cell Disruptor; Branson Sonic Power Company, Danbury, CT, USA). The lysates were centrifuged at 16,000 *g* for 10 min at 4° C, the supernatants were filtered on membranes with 0.22-µm diameter pores (Millipore, São Paulo, Brazil) and immediately stored at -70° C in aliquots.

Infection and treatment of animals, determination of lesion size and experimental design

L. braziliensis promastigotes (10^7), obtained from stationary-phase cultures, were subcutaneously inoculated into one of the hind footpads of BALB/c or C57Bl/6 mice one week after their being intradermally injected with *LaE* or *LbE* containing the amounts of protein that are indicated in the Figures. The hind pad thicknesses were weekly monitored with a digital caliper, until the sixth week post-infection and the lesion sizes estimated by subtracting the thickness of the uninfected pad from the thickness of the infected pad. Parasite loads in the footpads were estimated by limiting dilution [9] at the end of the experiments, as described below.

Quantification of tissue parasitism

Briefly, the infected pads were macerated in Schneider's medium and centrifuged at 50 *g* for 10 min, at 4° C. The supernatants were recentrifuged at 1,540 *g* for 10 min at 4°C, and the pellets were resuspended in Schneider's medium supplemented with 50 µg/mL gentamicin and 20% FBS. The suspension was serially diluted in 2-fold dilutions and distributed in triplicate in 96-well culture plates. The number of viable parasites in each footpad was determined from the reciprocal of the highest dilution at which promastigotes could be detected after 7 days at 23° C and was expressed as the number of parasites per lesion.

Statistical analyses

The type of data distribution was determined by the Shapiro-Wilk test. Because that distribution was non-Gaussian, the data were analysed by the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. Results were considered significant when the value of *P* was < 0.05. Comparisons between groups were in relation to the Saline group and/or between groups of different doses.

List of abbreviations

ACL: American cutaneous leishmaniasis

FBS: fetal bovine serum

IL-4: Interleukin 4

IL-10: Interleukin 10

LaE: *Leishmania amazonensis* extract

LbE: *Leishmania braziliensis* extract

TGF- β : Transforming growth factor beta

Th2: T helper type 2

Authors' contributions

CFA participated in its design and carried out all the experiments, VMGS conceived of the study and participated in its design, ACA carried out the measurement of lesion size, LSAF carried out quantification of tissue parasitism, VCJR and PSLS carried out the infection, treatment of animals, LCPC conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia -FAPESB (PRONEX) and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

References

1. Aebischer T, Morris L, Handman E: **Intravenous injection of irradiated *Leishmania major* into susceptible BALB/c mice: immunization or protective tolerance.** *International Immunology* 1994, **10**: 1535-1543
2. Bhowmick S, Mazumdar T, Ali N: **Vaccination route that induces transforming growth factor β production fails to elicit protective immunity against *Leishmania donovani* infection.** *Infection and immunity*. 2009, **77**: 1514-1523
3. Brelaz-de-castro MCA, De Almeida AF, Oliveira AP, Assis-Souza M, Rocha LF, Pereira VRA: **Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis**

- patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. *Cellular Immunology* 2012, **279**: 180-186
4. Brasil: *Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica 2007: 182
 5. Carvalho PL, Passos TS, Jesus RA: **Immunopathogenesis of Tegumentary Leishmaniasis**. *Gazeta médica da Bahia*. 2005, **1**: p.57-65
 6. Carrión J, Folgueira C, Soto M, Fresno M, Requena J.M: ***Leishmania infantum* HSP70-II null mutant as candidate vaccine against leishmaniasis: a preliminary evaluation**. *Parasites e vectors* 2011, **150**: 2-10
 7. Dorval CMM, Oshiro TE, Cupollilo E, Oshiro TE, De Castro CCA, Alves PT: **Occurrence of American tegumentary leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State associated to the infection for *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2006, **1**: 43-46
 8. Granfell RFQ, Marques-da-Silva, Souza-testasi CCA, Coelho, EAF, Fernandes AP, Afonso LCC, Rezende SA: **Antigenic extracts of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* associated with saponin partially protects BALB/c mice against *Leishmania chagasi* infection by suppressing IL-10 and IL-4 production**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2010, **105**: 818-822
 9. Lima HC, Bleyenbergh JA, Titus RG: **A Simple Method for Quantifying *Leishmania* in Tissues of Infected Animals**. *Parasitology Today* . 1997, **13**: 80-82
 10. Pinheiro RO, Pinto EF, Lopes JRC, Guedes HLM, Fertanes FR, Rossi-Bergmann B: **TGF- β -associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens**. *Microbes and Infection* 2005, **7**: 1317-1323
 11. Scott PA, Farrell JP: **Experimental cutaneous leishmaniasis: disseminated leishmaniasis in genetically susceptible and resistant mice**. *Am J Trop Med Hyg*. 1982,**31**: 230-238.

12. Silva VMG, Larangeira DF, Oliveira PRS, Sampaio RB, Suzart P, Biointervention Student Group, Nihei J, Teixeira MCA, Mengel JO, Dos Santos W.L.C.; Pontes-de-Carvalho L: **Enhancement of experimental cutaneous leishmaniasis by *leishmania* molecules with serine protease activity. I. Requirement of IL-4.** *Infection and Immunity*. 2011,**79**:1236-1243

13. Taveres NM, Santos DM, Oliveir, CI, Brodskyn: **Vaccination strategies against visceral and cutaneous leshmaniasis: lessons from the experimental models.** *Gazeta Médica da Bahia* 2009, **79**: 110-121

14. Teixeira MC, De Jesus SR, Sampaio RB, Pontes De Carvalho LC, Dos Santos WC: **A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species.** *Parasitol*. 2002, **88**: 963 – 968

15. Weiss R, Scheiblhofer S, Thalhamer J, Bickert T, Richardt, U, Fleischer B, Ritter, U: **Epidermal inoculation of *Leishmania*-antigen by gold bombardment results in a chronic form of leishmaniasis.** *Vaccine*. 2007, **25**: .25-33

Figures

Figure 1 - Effect of intradermal injection of *L. amazonensis* extract (LaE) in the infection of BALB/c mice by *L. braziliensis*

(A) Lesion size at the sixth week after infection in groups of six BALB/c mice. (B) Number of parasites per lesion as estimated by limiting dilution, as described in the Material and Methods, at the sixth week after infection. The animals were treated with intradermal injections of saline or of LaE containing 1.25, 5 or 20 µg of protein, one week before being infected with 10^7 *L. braziliensis* promastigotes in the stationary phase of growth. Each symbol represents the result obtained from one animal. The vertical bars represent the interval from the 1st to the 3rd quartile, and the horizontal lines represent the median values of each group. Comparisons between groups were performed by the multiple comparison test of Dunn. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 (in relation to the Saline group).

Figure 2 - Lesion size at the sixth week after infection in groups of eight BALB/c mice.

The animals were treated with intradermal injections of saline or of either *L. braziliensis* extract (LbE) (A) or *L. amazonensis* extract (LaE) (B) containing 5, 30 or 186 µg of protein, one week before being infected with 10^7 *L. braziliensis* promastigotes in the stationary phase of growth. Each symbol represents the result obtained from a single animal. Horizontal lines

represent the median values for each group. Comparisons of groups were performed by the multiple comparison test of Dunn. **P<0.01; ***P<0.001.

Figure 3 - Number of parasites per lesion as estimated by limiting dilution.

As described in the Material and Methods, at the sixth week after infection in groups of eight BALB/c mice. The animals were treated with intradermal injections of saline or of either *L. braziliensis* extract (LbE) (A) or *L. amazonensis* extract (LaE) (B) containing 5, 30 or 186 µg of protein, one week before being infected with 10^7 *L. braziliensis* promastigotes in the stationary phase of growth. Each symbol represents the result obtained from a single animal. Horizontal lines represent the median values for each group. Comparisons of groups were performed by the multiple comparison test of Dunn. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Figure 4 - Lesion size at the sixth week after infection of BALB/c mice and C57Bl/6 mice.

The animals (n = 4-6 per group) were treated with intradermal injections of the vehicle (Saline C57Bl/6) or of *L. amazonensis* (LaE BALB/c and LaE C57Bl/6) or *L. braziliensis* (LbE C57Bl/6) extracts containing 5 µg of protein, one week before being infected with 10^7 *L. braziliensis* promastigotes in the stationary phase of growth. Each symbol represents the result obtained from a single animal. Horizontal lines represent the median values for each group. Comparisons of groups were performed by the multiple comparison test of Dunn. *P<0.05.

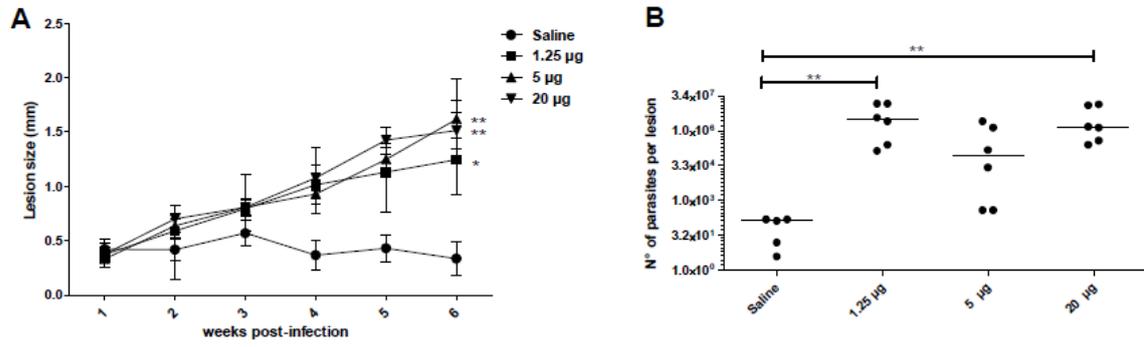


Figure 1

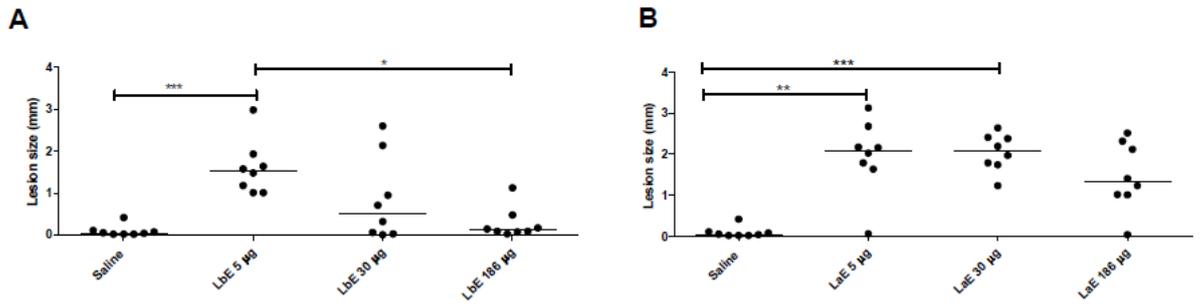


Figure 2

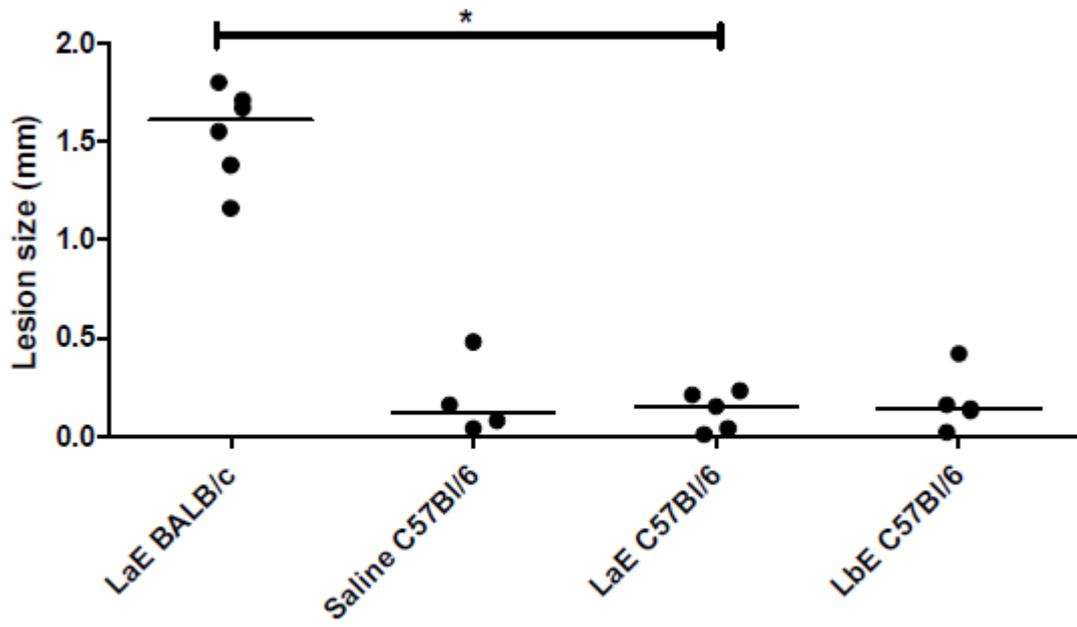


Figure 4