LEONARDO GARCIA VELASQUEZ

**Efeitos da resposta imune no curso da infecção de BALB/c,
BALB/c nude e C57BL/6 e na expressão de proteínas específicas
em formas amastigotas de *L. amazonensis* isolados de BALB/c e
BALB/c nude**

Tese apresentada ao Programa de Pós –
graduação em Biologia da Relação Patógeno
Hospedeiro do Instituto de Ciências Bi-
omédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em Ci-
ências.

Área de concentração: Biologia da Relação
Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Simonsen
Stolf.

Versão corrigida. A versão original eletrônica
encontra-se disponível tanto na Biblioteca do
ICB quanto na biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD)

SÃO PAULO
2014

RESUMO

VELASQUEZ, L. G. **Efeitos da resposta imune no curso da infecção de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 e na expressão de proteínas específicas em formas amastigotas de *L. amazonensis* isolados de BALB/c e BALB/c nude.** 2014. 89f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A leishmaniose é uma doença causada por parasitos do gênero *Leishmania* e transmitida por insetos flebotomíneos. Dados da Organização Mundial da Saúde estimam que mais de 12 milhões de pessoas já foram infectadas por este parasito e aproximadamente 350 milhões de indivíduos residem em áreas de risco. A infecção por *L. amazonensis* pode se apresentar sob a forma mais simples da doença cutânea até formas mais agressivas como a cutânea difusa. Diversos estudos utilizando parasitas cultivados e modelos animais têm sido realizados com o objetivo de investigar moléculas importantes para a sobrevivência do protozoário, assim como a resposta do sistema imune do hospedeiro. No entanto, pouco se sabe sobre como a expressão dessas moléculas é modulada pela resposta imune no modelo experimental murino. O presente trabalho teve como objetivo comparar o perfil da infecção por *L. amazonensis* em BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6, e avaliar a expressão das proteínas CP, LACK, LRR17, metacaspase, PDI e STI, potencialmente relacionadas com virulência, em amastigotas isolados de BALB/c e BALB/c nude. Avaliamos a infecção durante 13 semanas e observamos aumento mais precoce da espessura da pata em BALB/c do que em BALB/c nude, possivelmente devido a deficiência de células T nos animais atímicos, o que gera baixa resposta inflamatória no local da infecção. A carga parasitária nos animais nude foi superior à dos demais ao final de 13 semanas de infecção. Por outro lado, animais C57BL/6 controlaram a infecção a partir da sexta semana, com retorno da espessura da pata e baixo número de parasitas. O maior recrutamento de células após a infecção em BALB/c foi reforçado pela observação de aumento de baço somente nessa linhagem. Uma análise da expressão gênica nas lesões mostrou um padrão misto Th1/Th2 em todos os animais, e maior expressão de *IFN-γ*, *IL-4*, *IL1β* e *iNOS* em BALB/c ao final de 13 semanas. Em baço e linfonodo observamos baixa expressão de CD3e e elevada expressão de *iNOS* em BALB/c nude, sugerindo que células NK exerçam importante estímulo sobre macrófagos nesses animais. A análise por FACs mostrou em baço e linfonodo a esperada baixa porcentagem de células TCD4 e T CD8 em BALB/c nude, no entanto com capacidade de produzir *IFN-γ* e *IL-4*. A avaliação da expressão de proteínas potencialmente relacionadas a sobrevivência/virulência em amastigotas mostrou que LACK e metacaspase estão aumentadas nos parasitas isolados de BALB/c nude em relação aos isolados de BALB/c, e a metacaspase apresentou maior atividade também em amastigotas dos camundongos atímicos. Esses dados reforçam a ideia de que a resposta imune do hospedeiro modula a expressão de proteínas em *L. amazonensis*. Não observamos diferença na expressão da LACK e metacaspase em amastigotas isolados de macrófagos infectados na presença de *IFN-γ* e *IL-4*, sugerindo que essas citocinas isoladamente não são responsáveis pela modulação na expressão dessas proteínas pelo parasito. Através análise histopatológica pudemos comprovar maior infiltrado celular em BALB/c, assim como maiores alterações teciduais causadas pela infecção. Nossos resultados reforçam a importância de se estudar aspectos do parasita e do hospedeiro para melhor compreensão da diversidade das manifestações da leishmaniose.

Palavras chave: *Leishmania amazonensis*. Linhagens Murinas. Camundongo Nude. Fatores de Virulência. Expressão Proteica.

ABSTRACT

VELASQUEZ, L. G. **Effects of the immune response in the course of infection in BALB/c, BALB/c nude mice and C57BL/6 and in the expression of specific proteins in *L. amazonensis* amastigotes from BALB/c and BALB/c nude.** 2014. 89p. Doctor thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Leishmaniasis is a disease caused by parasites of *Leishmania* genus, transmitted by phlebotomine sandflies. World Health Organization estimates that more than 12 million people are infected by the parasite and that approximately 350 million live in risk areas. Infections by *Leishmania amazonensis*, the second most common species in Brazil, have clinical forms varying from the simplest cutaneous to the more aggressive cutaneous diffuse disease. Several studies have been performed using animal models aiming to identify molecules important for parasite survival and for host immune response. However, little is known about how these molecules are modulated by immune response in experimental murine model. The aim of this study was to compare the profile of the infection by *L. amazonensis* in BALB/c, BALB/c nude and C57BL/6 and to analyze the expression of CP, LACK, LRR17, metacaspase, PDI and STI proteins, potentially associated with virulence, in amastigotes isolated from BALB/c and BALB/c nude lesions. We evaluated the infection during 13 weeks and observed an early increase in footpad thickness in BALB/c compared to BALB/c nude, probably due to T cell deficiency in the athymic mice, leading to a reduced inflammatory response in the lesions. Parasite loads in nude mice were higher than in the other two mice after 13 weeks of infection. C57BL/6 mice, on the other hand, controlled infection since the sixth week, showing regression of footpad thickness and low parasite numbers. The higher cell recruitment in BALB/c after infection was corroborated by the increase of spleen observed only in these mice. Gene expression analysis of the lesions indicated a mixed Th1/Th2 pattern in all mice, and higher expression of IFN- γ , IL-4, IL1 β and iNOS in BALB/c after 13 weeks of infection. In spleens and lymph nodes we observed lower expression of CD3e and high expression of iNOS in BALB/c nude, suggesting that NK cells have an important role in stimulating macrophages in these mice. FACs analysis of spleens and lymph nodes showed the expected low percentages of TCD4 and T CD8 cells in BALB/c nude, but indicated that these cells were capable of producing IFN- γ and IL-4. The quantification of proteins potentially related to survival/virulence in amastigotes revealed that LACK and metacaspase are increased in parasites isolated from BALB/c nude compared to BALB/c, and that metacaspase had higher enzymatic activity in amastigotes from the athymic mice. These data support that host immune response can modulate the expression of *L. amazonensis* proteins. We didn't observe differences in LACK or metacaspase in amastigotes isolated from macrophages infected in the presence of IFN- γ and IL-4, suggesting that these cytokines alone are not responsible for the modulation of the expression of these proteins by the parasite. By histopathological analysis we proved most cell infiltrate in BALB/c as well as larger tissue changes caused by infection. Our results reinforce the importance of studying aspects of the parasite and the host to better understand the diversity of leishmaniasis manifestations.

Keywords: *Leishmania amazonensis*. Murine Strains. Nude Mice. Virulence Factors. Protein Expression.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A biologia da *Leishmania*

A *Leishmania* é um protozoário que pertence à ordem *Kinetoplastida* e à família dos *Trypanosomatidae*. O parasito apresenta duas formas principais: a promastigota (flagelada), encontrada no trato digestivo do vetor, e a amastigota (sem flagelo externo), encontrada no interior de células fagocíticas (LAINSON; SHAW, 1987; MCMAHON-PRATT E ALEXANDER, 2004; WHEELER et al., 2011). No vetor, a *Leishmania* passa por transformações morfológicas e estruturais, as quais são fundamentais a sua sobrevivência no interior do trato digestivo e também a sua infectividade e virulência. Nas primeiras horas no vetor as formas amastigotas transformam-se em promastigotas, que sintetizam moléculas importantes para sua sobrevivência (SACKS E KAMHAWI, 2001). Dentre essas moléculas destacam-se a LPG (Lipofosfoglicano) e a PPG (Proteofosfoglicano), as quais se relacionam com a proteção do parasito contra a ação de enzimas digestivas, e com a adesão ao epitélio do trato digestivo médio, impedindo sua liberação com as fezes (SACKS, 2001). No vertebrado a LPG também parece estar relacionada com a resistência à lise mediada pelas proteínas do sistema complemento e ao stress oxidativo (SPATH et al., 2003), além de ser importante na adesão à membrana de macrófagos (DESCOTEAUX et al., 1992; MCCONVILLE et al., 1992). Ainda no interior do vetor as formas promastigotas sofrem a metaciclogênese. Esse processo é caracterizado por alterações morfológicas no parasito, que fica mais estreito, assim como estruturais, como por exemplo alterações no LPG, o qual que passa a ter maior número de sacarídeos fosforilados em sua membrana, que o torna mais resistente a ação do sistema complemento (TURCO, 1992).

A infecção do hospedeiro vertebrado é caracterizada pelo regurgitamento de saliva durante o repasto sanguíneo, que contem formas promastigotas metacíclicas (LAINSON; SHAW, 1987; (WHEELER et al., 2011). Esses parasitos são fagocitados primeiramente por células do sistema imune inato como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (TRIPATHI et al., 2007). No interior dessas células o parasito transforma-se em amastigota, forma essa mais resistente ao ambiente hostil do fagolisossomo (NADERER E MCCONVILLE, 2008). Além de células, proteínas do complemento também interagem com o parasita. A metaloproteinase denominada de gp63 da *Leishmania* é capaz de fixar complemento e converter o C3b em C3bi (forma inativa), o que torna o parasito mais resistente à lise mediada por essas proteínas, por impedir a formação do Complexo de Ataque à Membrana - MAC (BRITTINGHAM et al., 1995). De fato, parasitos mutantes para a gp63 não sofrem alterações no desenvolvimento no interior

do vetor, porém tornam-se mais sensíveis à atividade do sistema complemento (JOSHI et al., 2002).

1.2 Epidemiologia

Diversas espécies de *Leishmania* são causadoras da leishmaniose, doença disseminada pelo mundo todo. Na América do Sul, a leishmaniose foi denominada de “Mal de los Andes”, já que eram observadas lesões em indivíduos que adentravam a região, assim como nos índios que ali residiam. Em 1855, Cerqueira relacionou-a com o Botão do Oriente, que era o nome dado a ela em algumas regiões no velho mundo. Em 1903, Donovan e Leishman, descreveram o parasito em um caso de calazar na Índia. Nesse mesmo ano, Ross denominou-o de *Leishmania donovani*. No Brasil, os primeiros relatos datam do final do séc. XIX, sendo que em 1909 Lindenberg encontrou o parasito em lesões de trabalhadores do Estado de São Paulo. Na década de 20 do séc. XX Aragão descreveu o papel do flebotomíneo na transmissão da doença (DE OLIVEIRA et al., 2005).

Estima-se que existam atualmente aproximadamente 350 milhões de indivíduos em áreas de risco e milhões apresentam a doença ativa, divididos entre as formas cutânea e visceral, sendo a grande maioria deles residentes em países como Índia, Afeganistão, Síria, Brasil e Peru (MCMAHON-PRATT E ALEXANDER, 2004). A cada ano, aproximadamente 1,5 milhões de novos casos são notificados, dos quais, aproximadamente 1,3 milhões são da forma tegumentar (cutânea e mucocutânea) e 200.000 da visceral. O número de óbitos anuais ultrapassa a faixa de 40.000 pessoas (MCCONVILLE E HANDMAN, 2007).

O aumento do número de casos observado recentemente no Brasil está intimamente relacionado com as modificações causadas pelo homem no meio ambiente e, consequentemente, as mudanças territoriais dos vetores que, aliadas ao aumento populacional em áreas endêmicas e à diminuição nas medidas de controle de vetores da malária e Doença de Chagas, promovem o surgimento dos mesmos no peridomicílio (GONTIJO E DE CARVALHO MDE, 2003). Outro aspecto relevante na disseminação da doença é o grande trânsito de pessoas durante guerras, como por exemplo nas guerras no Iraque e Afeganistão, países endêmicos para a doença, que recebem pessoas de diversas regiões do mundo, muitas delas sem qualquer tipo de conhecimento sobre leishmaniose (SHAW, 2003). Além dos aspectos discutidos acima, nos últimos anos tem-se observado aumento no número de casos de leishmaniose em pacientes portadores do vírus HIV devido à imunossupressão desencadeada pelo vírus (MOLINA et al., 2003).

No Brasil a distribuição da leishmaniose cutânea é bastante ampla. Em 2013 foram notificados 18.226 casos da leishmaniose tegumentar americana, das quais, aproximadamente 13.700 casos são das regiões norte e Nordeste (BRASIL, 2015). Os padrões de transmissão da doença são classificados de acordo com o local onde ocorre a infecção. Dessa forma, ela pode apresentar-se pela forma silvestre, quando o hospedeiro invade um ambiente com essas características; laser, que se caracteriza pela infecção acidental do hospedeiro ao realizar tal prática, como por exemplo em uma pescaria e a periurbana, que se caracteriza pela infecção em decorrência do avanço de áreas urbanizadas em locais que eram de natureza silvestre. (BRASIL, 2010).

Já a forma visceral é endêmica em mais de 70 países. Nas Américas 90% dos casos estão no Brasil. No ano de 2013 foram registrados 3.253 casos, destes, aproximadamente 2.300 são da região norte e nordeste. Do total registrado em 2013, 231 foram a óbito (BRASIL, 2015).

Dentre as diversas espécies do parasito, são responsáveis por infecções que podem resultar na forma cutânea espécies como: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania mexicana*; na forma cutânea difusa: *Leishmania amazonensis*, na forma mucocutânea *Leishmania braziliensis* e sob a forma visceral: *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani* (DESJEUX, 2004; GUERIN et al., 2002)

1.3 Aspectos clínicos

As manifestações clínicas da leishmaniose são bastante amplas. Basicamente elas se dividem em cutânea (localizada ou disseminada ou difusa), mucocutânea ou visceral. Cada uma dessas formas está relacionada com a espécie do parasito e com o perfil de reposta imune do hospedeiro (MCGWIRE E SATOSKAR, 2014; SILVEIRA et al., 2009)

A leishmaniose cutânea localizada é caracteriza pela presença de lesões geralmente arredondadas com bordas elevadas, que podem ser únicas ou múltiplas (GONTIJO E DE CARVALHO MDE, 2003). Inicialmente elas se assemelham com uma picada de inseto que evoluem com o tempo, aumentando de tamanho e profundidade Normalmente é a forma menos agressiva da doença, já que em alguns casos sua resolução se dá sem a necessidade de terapia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Em alguns casos podem ocorrer infecções secundárias de origem bacteriana, as quais mudam a característica das lesões, que passam a apresentar crostas purulentas e eczema. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). As espécies mais relacionadas à forma cutânea no Brasil

são: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania lainsoni*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis* (LAINSON, 1997). Uma condição especial da forma cutânea, observada em alguns pacientes infectados por *Leishmania amazonensis* é a forma difusa, a qual se caracteriza pela formação de nódulos ricos em parasitos (sem ulceração) por todo o corpo (MCGWIRE E SATOSKAR, 2014). Nessa condição observa-se má resposta imunológica mediada por células T (anergia) do hospedeiro ao parasito, assim como à terapia. No início o paciente apresenta lesão única, mas que, com o passar do tempo se disseminam pelo corpo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). O diagnóstico clínico diferencial deve ser feito contra a Hanseníase virchowiana (GONTIJO E DE CARVALHO MDE, 2003)

A forma mucocutânea, no Brasil, é desencadeada principalmente pela infecção por *Leishmania braziliensis* e caracteriza-se por um infiltrado inflamatório na mucosa nasal e oral. Diferente da forma cutânea, em que há possibilidade de resolução espontânea, ela necessita obrigatoriamente de tratamento para remir (GONTIJO E DE CARVALHO MDE, 2003). Aproximadamente 3% dos portadores da forma cutânea localizada desenvolvem essa forma clínica e isso está relacionado aos casos onde não houve utilização de terapia ou a mesma foi realizada de forma inadequada. É mais comum em homens que em mulheres, principalmente naqueles casos onde há lesões extensas acima da cintura e com mais de um ano de evolução. Sugere-se que a forma mucocutânea ocorra por via hematogênica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A forma visceral é a mais grave de todas devido ao comprometimento de órgãos vitais como, fígado, baço e medula óssea. A proliferação dos parasitos no interior desses tecidos leva a uma hepatoesplenomegalia e supressão medular. As espécies relacionadas com essa forma clínica são *L. infantum* na África e Oriente Médio, *Leishmania donovani* na Índia e China e *Leishmania infantum* no Brasil (MCGWIRE E SATOSKAR, 2014).

1.4 Relação Parasito Hospedeiro

1.4.1 Resposta imune durante a infecção por *Leishmania*

Na leishmaniose observam-se padrões de resposta imune de acordo com o parasito envolvido e com o hospedeiro. O modelo experimental mais utilizado até hoje é o de infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6 por *L. major*. A primeira linhagem é suscetível e desenvolve lesões, enquanto que a segunda é resistente (SILVA et al., 2008). Tal fato está direta-

mente relacionado com diferenças no perfil de citocinas produzidas durante o curso da infecção nos dois animais (HEINZEL et al., 1989).

Este modelo foi usado para caracterizar a função desempenhada por macrófagos M1 (associados a resposta Th1) e M2 (associados a resposta Th2) (MILLS et al., 2000). Foi mostrado que o estímulo de macrófagos M1 com LPS levou à produção de Óxido Nítrico (NO), o qual inibe a divisão celular (proliferação). Já na linhagem M2 observou-se após estímulo com LPS um aumento no metabolismo de arginina a ornitina, que estimula a proliferação celular. Estes mesmos autores mostraram ainda que o TGF- β 1 produzido por macrófagos (M2) inibe a síntese de NO (MILLS et al., 2000).

Animais BALB/c infectados por *L. major* apresentam um perfil predominante de resposta imune do tipo Th2, com liberação de citocinas como IL-4 e IL-10, diferente dos C57BL/6, caracterizados pela liberação de citocinas como IFN- γ e IL-12, as quais estimulam a síntese de (NO) nos macrófagos infectados, resultando assim em bom prognóstico no caso de infecção por *Leishmania* (HEINZEL et al., 1989). Em animais suscetíveis à infecção por *L. major* ocorre também a elevação de receptores para IL-4 que antecede a resposta Th2, sendo fundamental na diferenciação de linfócitos T CD4 (FERNANDEZ-BOTRAN et al., 1999). A expressão dos receptores para IL-4 está relacionada com a presença de IL-12.

Neutrófilos também podem ser infectados por *Leishmania*, e podem interferir na infecção de macrófagos. Eles apresentam atividade leishmanicida na presença de TNF- α , mas sob efeito de TGF- β 1 e PG2 permitem multiplicação dos parasitos (AFONSO et al., 2008). A interação em meio de cultura de macrófagos com macrófagos infectados por *L. amazonensis* em apoptose leva a produção de TGF- β , permitindo a multiplicação dos parasitos. Por outro lado, a liberação de elastase por neutrófilos necróticos promove a ativação de macrófagos e liberação de TNF- α , o qual destrói os parasitos intracelulares (AFONSO et al., 2008).

Quando camundongos são infectados por *L. amazonensis* o perfil de resposta imune não segue um padrão dicotômico como observado para *L. major* (TRIPATHI et al., 2007). De fato, animais BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* não são capazes de erradicar o parasito, como ocorre nas infecções por *L. major*, embora C57BL/6 apresente maior resistência que BALB/c, como constatado pela carga parasitária nas lesões e tamanho das mesmas (FELIZARDO et al., 2007). Durante o curso da infecção observam-se citocinas que caracterizam uma resposta Th2 como IL-4 e também citocinas do tipo Th1, como IFN- γ (Ji et al., 2002). Estudos da infecção em animais CBA/J mostraram que a infecção por *L. amazonensis* não foi diferente da causada por *L. major* no início do processo, mas que após doze horas as lesões causadas por *L. amazonensis* foram duas vezes maiores. A adição de IFN- γ aos meios

de cultura levou ao controle de *L. major*, mas TNF- α e IFN- γ foram necessários para regressão na carga parasitária de *L. amazonensis* nas células infectadas (GOMES et al., 2003). A suscetibilidade de linhagens como BALB/c e C57BL/10 a *L. amazonensis* está mais relacionada com a ausência de resposta Th1 do que com o predomínio da resposta Th2, e animais tratados com anti-IL4 apresentaram uma redução no tamanho das lesões (AFONSO E SCOTT, 1993).

Diferenças entre linhagens murinas infectadas por *L. amazonensis* foram também analisadas em termos de resposta humoral. Animais BALB/c produziram anticorpos da classe IgG contra moléculas secretadas pelos parasitos, o que não foi observado em C57BL/6 (HERNANDEZ-CHINEA, 2007). Além disso, linfócitos B e anticorpos parecem estar envolvidos na fisiopatologia da doença, já que em animais JhD o desenvolvimento de lesões é menor que em BALB/c selvagens (WANASEN et al., 2008).

Outro fator relevante na infecção por *L. amazonensis* é a interferência das formas amastigotas nas funções exercidas pelas células dendríticas (XIN et al., 2008). Foi demonstrado que o parasito causa deficiência na apresentação de antígenos e diminuição na liberação de IL-12 (FAVALI et al., 2007; XIN et al., 2008), além de diminuição da expressão de CD80 na superfície dessas células, prejudicando assim o processo de diferenciação e apresentação de antígenos (FAVALI et al., 2007).

A atividade leishmanicida de macrófagos está intimamente relacionada com a produção de NO por estas células (GAUR et al., 2007; MUKBEL et al., 2007). *L. amazonensis* tem capacidade de inibir a Óxido Nítrico Sintetase (iNOS) tanto em termos de atividade quanto da transcrição de seu gene (BALESTIERI et al., 2002).

Como mostrado nos exemplos acima, os diferentes perfis de resposta imune dos camundongos infectados por *Leishmania* determinam o curso da infecção. A expressão de moléculas específicas pelo parasito está relacionada com mecanismos de evasão ao sistema imune do hospedeiro.

1.4.2 Evasão imunológica e sobrevivência intracelular – moléculas relacionadas

Parasitos do gênero *Leishmania* apresentam extrema capacidade de burlar a resposta imune do hospedeiro (TRIPATHI et al., 2007; WANDERLEY et al., 2006; WILKINS-RODRIGUEZ et al., 2010; XIN et al., 2008). Diversos mecanismos são utilizados nesse escape, e serão descritas adiante algumas moléculas sintetizadas por este parasito relacionadas com os mecanismos de evasão imunológica. Esses mecanismos podem depender do tipo de resposta imune a

qual é submetido, como evidenciado pela exposição diferencial de PS em amastigotas provenientes de diferentes linhagens murinas (WANDERLEY et al., 2006), que será descrita adiante.

A dinâmica da resposta imunológica à *L. major* caracteriza-se primeiramente pela chegada de neutrófilos no local do inóculo já nos primeiros 40 minutos de infecção (LASKAY et al., 2003; RIBEIRO-GOMES E SACKS, 2012). O papel dos neutrófilos na infecção por *Leishmania* é controverso. Foi mostrado que no interior dessas células os parasitos podem continuar vivos e capazes de infectar macrófagos de forma silenciosa e que em animais depletados de neutrófilos os níveis de IL-1 α e β são maiores, o que favorece o controle do parasito (PETERS et al., 2008), outro estudo com *L. amazonensis* mostrou que macrófagos infectados em cultura com neutrófilos apresentaram maior controle da infecção (DE SOUZA CARMO et al., 2010). De fato, a interação de macrófagos com neutrófilos em apoptose infectados por *L. amazonensis* leva a produção de TGF- β e PGE-2, permitindo a multiplicação dos parasitos (AFONSO et al., 2008). Por outro lado, a liberação de elastase por neutrófilos necrosados permite a ativação de macrófagos e liberação de TNF- α , o qual destrói os parasitos intracelulares (RIBEIRO-GOMES et al., 2007).

Além da apoptose do neutrófilo, a apoptose ou processo semelhante contribui para o aumento da infecção por promastigotas de *Leishmania*. A presença no inóculo de formas promastigotas “em apoptose”, processo que se caracteriza pela morte celular sem ativação da resposta inflamatória, garante a sobrevivência dos demais parasitos por reduzir a resposta inflamatória do macrófago (WANDERLEY et al., 2009). Em *L. major*, aproximadamente metade das formas promastigotas em fase estacionária expõem na face externa de sua membrana a “Fosfatidil Serina” (PS) (VAN ZANDBERGEN et al., 2006), a qual é exposta na face externa da membrana em células apoptóticas (FADOK et al., 1998). Com isso, células fagocíticas passam a sintetizar TGF- β , citocina anti-inflamatória que reduz a produção de TNF- α , favorecendo assim a sobrevivência do parasito no seu interior (VAN ZANDBERGEN et al., 2006).

No interior dos macrófagos as formas promastigotas transformam-se em amastigotas, as quais apresentam maior resistência ao ambiente hostil do fagolisossomo. Para *L. donovani* foi observado que a fusão do vacúolo parasitóforo aos lisossomos é retardada, impedindo assim que os parasitos pudessem ser destruídos pela ação de enzimas presentes nessa organela. No entanto, em *L. donovani* foi verificado que ao serem fagocitados por macrófagos esses parasitos entram em contato com as enzimas lisossomais e continuam apresentando motilidade, ou seja, continuam vivos (FORESTIER et al., 2011). Por outro lado, na infecção por *L. amazonensis* observa-se a formação de vacúolos parasitóforos nas primeiras 24 horas de infecção

(COURRET et al., 2002; REAL et al., 2008), os quais apresentam pH ácido, mas que não impedem a sobrevivência de formas amastigotas no seu interior (ANTOINE et al., 1990).

Além da ação enzimática dos lisossomos, um importante mecanismo de combate a *Leishmania* se dá pela produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos, que é aumentada quando macrófagos são estimulados por IFN- γ (HEINZEL et al., 1989). Este NO é sintetizado a partir da NOS (Óxido Nítrico Sintetase) que utiliza como substrato a L-Arginina, criando ambiente altamente microbicida (GAUR et al., 2007). Um estudo utilizando formas promastigotas e amastigotas de *L. mexicana* demonstrou que ambas as formas evolutivas do parasito são capazes de reduzir a produção celular de NO através da inibição de fatores transcricionais como NF- κ B, STAT-1 α e AP-1, os quais são de fundamental importância na síntese de IFN- γ (ABU-DAYYEH et al., 2010). Assim como observado em macrófagos, *L. mexicana* também apresenta capacidade de inibir a produção de NO no interior de células dendríticas, que são importantes apresentadoras de antígenos, fundamentais ao desenvolvimento de uma resposta imune específica contra o parasito. Essas células, quando estimuladas com LPS ou IFN- γ e infectadas com formas amastigotas de *L. mexicana* apresentavam diminuição da síntese de NO por inibição da Óxido Nítrico Sintetase (iNOS) sem alteração nos níveis de mRNA (REAL et al., 2014; WILKINS-RODRIGUEZ et al., 2010; XIN et al., 2008)

No interior das células do sistema mononuclear fagocitário as formas amastigotas, que apresentam resistência às enzimas presentes no fagolisossomo (ABU-DAYYEH et al., 2010) passam por um processo de multiplicação o qual é finalizado pelo rompimento da membrana da célula do hospedeiro e liberação de novos parasitos, que serão fagocitados (SACKS E NOBEN-TRAUTH, 2002).

Uma importante molécula da *Leishmania* que pode envolver na fagocitose de amastigotas é a já citada “Fosfatidilserina” (PS). Esses amastigotas expõem PS em sua superfície, mas ao contrário dos promastigotas não entram em apoptose, sobrevivendo no interior do macrófago. Este processo foi denominado mimetismo apoptótico, e parece ser uma estratégia eficaz de evasão do parasito (BARCINSKI et al., 2003; DE FREITAS BALANCO et al., 2001; EL-HANI et al., 2012; WANDERLEY E BARCINSKI, 2010). Foi verificado que a exposição de “PS” na superfície de amastigotas de *L. amazonensis* é maior quando estes eram isolados de animais BALB/c em comparação aos de C57BL/6, mostrando que o hospedeiro exerce papel importante no controle da exposição desse fosfolípido (WANDERLEY et al., 2006). A exposição dessa molécula promove aumento na produção de TGF- β pelos macrófagos e, consequentemente, diminuição de sua atividade inflamatória “leishmanicida” (WANDERLEY et al., 2006).

Outra consequência da exposição de “PS” é a modulação do perfil de citocinas para Th2 (IL-4 e IL-10), inibindo a produção de NO e favorecendo a multiplicação dos parasitos (DE FREITAS BALANCO et al., 2001). Embora em todos os trabalhos citados acima a exposição de “PS” seja utilizada como um marcador de apoptose, análises de cromatografia, espectrometria de massa e ressonância nuclear magnética mostraram que parasitas de *Leishmania* expõem diferentes fosfolipídios, mas não PS (WEINGARTNER et al., 2012). Dessa forma, a marcação considerada “PS” com anexina V utilizada nesses estudos, pode indicar a presença de ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol e fosfatidilinositol (WEINGARTNER et al., 2012). De qualquer forma, os trabalhos citados mostram que a exposição de algum fosfolipídio ligante de anexina V, seja qual for sua identidade, é um indicador de apoptose e está associada ao silenciamento da resposta inflamatória do macrófago. Por essa razão denominamos esse fosfolipídio de “PS”.

As caspases, descobertas em *C. elegans*, são proteases envolvidas no processo de apoptose que apresentam elevada especificidade por ácido aspártico na posição P1 do substrato (COHEN, 1997). A metacaspase é uma enzima presente em plantas, fungos e protozoários (AMBIT et al., 2008), que também está envolvida no processo de apoptose (MADEO et al., 2002). Ela tem importantes funções no crescimento e morte celular e sua superexpressão em *Leishmania* levou a retardo no crescimento devido a problemas na segregação do cinetoplasto e divisão nuclear (AMBIT et al., 2008). A metacaspase de plantas (VERCAMMEN et al., 2004) e de *Leishmania* (GONZALEZ, 2009) tem especificidade por substratos com arginina/lisina, e essa atividade é exacerbada em meio rico em peróxido de hidrogênio, um importante indutor de apoptose (LEE et al., 2007).

A maioria das espécies de *Leishmania* possui um único gene da metacaspase, exceto *L. donovani* e *L. infantum*, que possuem dois genes (GANNAVARAM E DEBRABANT, 2012; LEE et al., 2007).

A abundância de mRNA de metacaspase é maior em amastigotas axênicos do que em formas promastigotas, sugerindo que essa proteína possua um papel importante durante a sobrevivência do parasito no interior de células de mamíferos, o que é coerente com a maior atividade “tripsina-like” observada em amastigotas (LEE et al., 2007).

Enquanto que alguns trabalhos mostram o papel da metacaspase na indução de morte, outros sugerem o contrario. Apesar de possuir dois genes para a metacaspase, o silenciamento de um deles em *L. donovani* causou interrupção do ciclo celular e morte celular programada. (RAINA E KAUR, 2012). De forma semelhante, um estudo utilizando uma *L. mexicana* nula para a metacaspase indicou que essa proteína age regulando negativamente a atividade

de na proliferação celular de formas amastigotas (CASTANYS-MUNOZ et al., 2012). De fato, macrófagos infectados com esses parasitos nulos tiveram maior índice de infecção, e a infecção de animais levou a maior desenvolvimento de lesão. Além disso, quando submetidos a stress por H₂O₂ ou miltefosina não houve diferença na morte celular.

Muitas moléculas estão envolvidas com o processo de evasão imunológica e sobrevivência desses parasitos. Dentre elas estão as Cisteíno-Peptidases (CP), enzimas que possuem papel importante na patogênese de infecções causada por protozoários, agindo como fator de virulência. Em *L. amazonensis*, formas promastigotas exibem menor atividade dessa enzima do que amastigotas, reforçando a importância dela durante a infecção em células de mamíferos (SILVA-ALMEIDA et al., 2012). Em *L. infantum* a CPA parece estar envolvida com o processo de infecção em células de mamíferos e a CPB, na degradação de MHC II no interior do vacúolo parasitóforo da célula infectada e produção de citocinas como IL-4 e TGF- β (MOTTRAM et al., 1998). Parasitos nulos para estas enzimas transformam-se em amastigotas com baixo poder de virulência em macrófagos (WILLIAMS et al., 2006). Em camundongos suscetíveis a *L. mexicana* a CPB está relacionada com a ativação de uma resposta imune Th2, com liberação de IL-4 e consequente inibição da resposta Th1. Um inibidor natural das CPs, primeiramente identificado em *Trypanosoma cruzi* e denominado de “chagasin” (MONTEIRO et al., 2001) foi identificado em *L. mexicana*. Os resultados demonstraram que a presença do inibidor melhora o controle da infecção, favorecendo o desenvolvimento de resposta imune do tipo Th1, enquanto que a infecção com parasitos nulos para o inibidor leva ao desenvolvimento de uma resposta imune basicamente Th2, com produção de IgE e falta de capacidade de resolução do quadro clínico (BRYSON et al., 2009). Em *L. mexicana* a CPB foi capaz de inibir a produção de IL-12, por afetar a clivagem do fator NF- κ B, além de agir sobre fatores transcricionais como STAT-1 e AP-1, impedindo sua translocação para o núcleo e diminuindo a síntese de NO estimulada por IFN- γ (SILVA-ALMEIDA et al., 2012). Os dados apresentados reforçam a idéia de que as CPs sejam proteínas importantes na modulação da resposta imune do hospedeiro.

Um outro antígeno do parasito relacionado com a modulação da resposta imune do hospedeiro é a LACK, um análogo do receptor da Kinase C de mamíferos, que está relacionado com a ativação da resposta Th2 em animais suscetíveis infectados por *L. major* (KELLY et al., 2003). O desenvolvimento da resposta Th2 se dá pela rápida ativação de células T LACK-específicas nos linfonodos drenantes e no local da infecção, fazendo com que elas sintetizem IL-4 e IL-10, permitindo assim a rápida proliferação dos parasitos (SCHILLING E GLAICHENHAUS, 2001). Macrófagos recém infectados por promastigotas são extremamente

hábéis em estimular linfócitos T reativos a este antígeno; no entanto, o mesmo não foi observado em macrófagos infectados por amastigotas (PRINA et al., 1996). Uma hipótese levantada pelos autores é que a LACK expressa pelos amastigotas não consegue ser apresentada via MHC II, por ter uma meia vida muito curta a ponto de não conseguir alcançar essas moléculas ou por não ser acessível a elas no fagolisossomo. Em decorrência da imunogenicidade da LACK e do papel dessa proteína na exacerbação da infecção por *Leishmania*, muito trabalhos estão sendo realizados visando a utilização dessa proteína no desenvolvimento de vacinas para a leishmaniose, alguns com resultados bastante promissores (DC et al., 2011; DE OLIVEIRA GOMES et al., 2012; FELIZARDO et al., 2012; GHAFARIFAR et al., 2013; HEZARJARIBI et al., 2013; HUGENTOBLE et al., 2012).

Outra proteína relacionada com virulência em *Leishmania* é a PDI (Proteína Dissulfeto Isomerase). Ela é uma chaperona de retículo endoplasmático rugoso cuja função está relacionada com a formação, redução e isomerização de ligações tipo dissulfeto em proteínas (HONG E SOONG, 2008) sendo importante na reorganização conformacional de proteínas que perderam suas pontes dissulfeto (YAO et al., 1997). Em infecções por *L. major* foi demonstrado que o uso de inibidores da PDI favorece a regressão da doença (BEN ACHOUR et al., 2002). Esse trabalho sugere que esta proteína esteja envolvida na interação com o hospedeiro, além de favorecer a sobrevivência do parasito no interior de suas células. Foram identificados os genes de PDI de *L. major*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (STOLF et al., 2011). A presença desta enzima foi confirmada em *L. amazonensis*, que possui pelo menos quatro PDIs (HONG E SOONG, 2008). A enzima foi relacionada com funções importantes na interação dessa espécie com células do hospedeiro, e inibidores específicos afetam o crescimento do parasito em cultura (HONG E SOONG, 2008).

Proteínas ricas em repetições de leucina (LRR) fazem parte da estrutura dos receptores Toll Like e NOD, os quais são extremamente importantes no processo de reconhecimento de patógenos por células o sistema imune (SCHUSTER E NELSON, 2000). Essas proteínas também têm importante papel nas interações entre parasito-hospedeiro (KEDZIERSKI et al., 2004), além de participarem de processos enzimáticos, tráfego celular e indução da apoptose. Em *Leishmania* também foram identificadas proteínas ricas em LRs. Em *L. major* foram caracterizadas algumas proteínas que contem LRR, como por exemplo a porção protéica do PPG (Proteofosfoglicano) e também a PSA₂ (*parasite antigen surface 2*), as quais fazem parte da membrana plasmática do parasito e são reconhecidas por macrófagos pelo receptor de complemento CR3 (KEDZIERSKI et al., 2004).

A LRR17 é uma proteína LRR que está presente no cromossomo 17 de *L. amazonensis* e é mais expressa em amastigotas, sugerindo que, além de estar relacionada com interações celulares, ela também possa exercer funções importantes para a sobrevivência do parasito em células de mamíferos (FRANCO, 2008 – tese de doutorado). Estudos com a LRR17 de *L. amazonensis*, *L. major* e *L. braziliensis* mostraram que esta proteína é expressa em formas amastigotas e promastigotas e que sua hiperexpressão em *L. amazonensis* promoveu aumento na infectividade e síntese de NO em macrófagos *in vitro* (da SILVA, 2011, tese de doutorado).

A STI (Proteína induzida pelo stress) de *Leishmania* possui atividade chaperona e faz parte da família das proteínas de choque térmico (HSPs) (WEBB et al., 1997). Essa proteína relaciona-se com outras da família como a HSP70 e HSP83 (FRYDMAN E HOHFELD, 1997), as quais estão relacionadas com a transformação das formas promastigotas em amastigotas no interior do macrófago, tendo em vista do aumento de sua expressão nesse processo (WIESGIGL E CLOS, 2001). A STI é uma proteína constitutiva em promastigotas e amastigotas, mas sua expressão pode ser regulada por a mudança de temperatura (WEBB et al., 1997). De fato, assim como ocorre para a HSP70, a taxa de síntese protéica da STI aumenta com o choque térmico, embora essa mudança seja sutil e nem sempre afete o montante celular dessa proteína, embora possa ter implicações funcionais (WEBB et al., 1997).

A expressão das proteínas da família das HSP é induzida em situações em que o parasito é submetido a condições de stress, como por exemplo na acidificação do vacúolo parasitóforo (SCHMIDT et al., 2011). De fato, a acidificação e o aumento da temperatura no interior do vacúolo parasitóforo alteram a expressão de inúmeros genes que culminam com a transformação das formas promastigotas em amastigotas (ZILBERSTEIN E SHAPIRA, 1994).

Diversos estudos sobre a STI tem sido direcionados ao desenvolvimento de vacinas (CAMPBELL et al., 2012; FUJIWARA et al., 2005; MATOS et al., 2013). Em um deles a STI de *L. major* foi capaz de gerar mais células T CD4 produtoras de IFN- γ , relacionadas com uma maior proteção em animais BALB/c (MATOS et al., 2013).

No presente trabalho analisamos o perfil da infecção em camundongos com diferentes suscetibilidades a *Leishmania amazonensis*: BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6. Além disso, avaliamos a expressão de algumas das proteínas associadas a virulência de *Leishmania* citadas acima em amastigotas isolados de lesões de BALB/c e BALB/c nude. Com essa última análise buscamos verificar se diferenças na pressão do sistema imune do hospedeiro são capazes de modular a expressão de proteínas importantes para a sobrevivência do parasita.

5 CONCLUSÕES

A partir de todos os dados apresentados podemos concluir que o curso da infecção por *L. amazonensis* ocorre de maneira diferente em BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6, e isso está relacionado com o perfil ou intensidade de resposta imune desenvolvido por cada um deles. Observamos em BALB/c maior desenvolvimento de lesões e resposta imune com padrão misto Th1 e Th2, com maior expressão de *iNOS*, *IFN- γ* , *TNF- α* , *IL-4* e *IL-1 β* , no entanto a carga parasitária no local da infecção e no linfonodo poplíteo foi inferior à encontrada em BALB/c nude, que apresentou baixa porcentagem de células T, e consequentemente pouca resposta inflamatória no local da infecção, as quais, no entanto, mostraram ser ativas na produção *IFN- γ* e *IL-4*. Esses animais apresentaram ainda maior expressão de *iNOS* em baço e linfonodo, possivelmente decorrente de células NK. Em C57BL/6 a infecção foi controlada a partir da sexta semana de infecção, de forma que no final da décima terceira o perfil de resposta imune não mostrava alterações significativas.

Com relação a expressão de proteínas relacionadas à virulência/sobrevivência, verificamos que a LACK e a metacaspase foram mais expressas em amastigotas isolados de BALB/c nude, o que mostra a modulação exercida pela resposta imune do hospedeiro. Uma explicação para esse fato seria a regulação negativa feita por células T na expressão dessas proteínas em amastigotas de *L. amazonensis*. É possível ainda, que a maior expressão da metacaspase possa estar relacionada com a proliferação celular do parasito, já que essa proteína mostrou-se ser mais expressa e ter maior atividade em amastigotas de BALB/c nude, o qual apresentava o maior número de parasitos no final das treze semanas. No entanto, dados na literatura com outras espécies mostraram o contrário e isso ressalta a importância de se aprofundar a pesquisa dessa proteína em *L. amazonensis*. Concluimos também que a modulação da expressão das duas proteínas não se baseia somente na diferença entre abundância de *IFN- γ* e *IL-4*, já que amastigotas isolados de macrófagos medulares sob o estímulo dessas citocinas não apresentaram diferença na expressão da LACK e metacaspase. Isso sugere que outras citocinas desempenhem papel importante nessa regulação.

Temos como perspectivas avaliar a expressão dessas proteínas em amastigotas isolados de pacientes que desenvolveram a forma cutânea e a difusa da doença, já que sabemos que na segunda os pacientes apresentam anergia de células T, que cria um ambiente bastante semelhante ao encontrado em BALB/c nude.

REFERÊNCIAS*

- ABU-DAYYEH, I. et al. Comparative study of the ability of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions. **Infect Immun**, v. 78, n. 6, p. 2438-45, Jun 2010.
- AFONSO, L. et al. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **J Leukoc Biol**, v. 84, n. 2, p. 389-96, Aug 2008.
- AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect Immun**, v. 61, n. 7, p. 2952-9, Jul 1993.
- AGUILAR TORRENTERA, F. et al. Parasitic load and histopathology of cutaneous lesions, lymph node, spleen, and liver from BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania mexicana*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 66, n. 3, p. 273-9, Mar 2002.
- AMBIT, A. et al. An essential role for the *Leishmania* major metacaspase in cell cycle progression. **Cell Death Differ**, v. 15, n. 1, p. 113-22, Jan 2008.
- ANTOINE, J. C. et al. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. **Infect Immun**, v. 58, n. 3, p. 779-87, Mar 1990.
- ARAVIND, L.; DIXIT, V. M.; KOONIN, E. V. The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. **Trends Biochem Sci**, v. 24, n. 2, p. 47-53, Feb 1999.
- BALESTIERI, F. M. et al. *Leishmania* (L.) *amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes Infect**, v. 4, n. 1, p. 23-9, Jan 2002.
- BARCINSKI, M. A. et al. The role of apoptotic mimicry in host-parasite interplay: is death the only alternative for altruistic behavior? **Kinetoplastid Biol Dis**, v. 2, n. 1, p. 6, Jun 25 2003.
- BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **J Clin Invest**, v. 118, n. 2, p. 413-20, Feb 2008.
- BEATTIE, L. et al. Transgenic *Leishmania* and the immune response to infection. **Parasite Immunol**, v. 30, n. 4, p. 255-66, Apr 2008.

* De acordo com:

Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR: 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BEN ACHOUR, Y. et al. Identification of a disulfide isomerase protein of *Leishmania major* as a putative virulence factor. **Infect Immun**, v. 70, n. 7, p. 3576-85, Jul 2002.

BOEHM, U. et al. Cellular responses to interferon-gamma. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 749-95, 1997.

BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS-FIOCRUZ/MINISTÉRIO DA SAÚDE). Monitoramento e Vigilância da Leishmaniose Tegumentar no Brasil 2ed. 2010. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_2ed.pdf [20 Mar 2015].

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose Tegumentar Americana. Dados Epidemiológicos. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LT-Casos.pdf> [26 Mar 2015].

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose Visceral no Brasil. Dados Epidemiológicos. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf> [26 Mar 2015].

BRITTINGHAM, A. et al. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **J Immunol**, v. 155, n. 6, p. 3102-11, Sep 15 1995.

BRYSON, K. et al. Overexpression of the natural inhibitor of cysteine peptidases in *Leishmania mexicana* leads to reduced virulence and a Th1 response. **Infect Immun**, v. 77, n. 7, p. 2971-8, Jul 2009.

CAMPBELL, C. G. et al. Decontamination After a Release of *B. anthracis* Spores. **Biosecure Bioterror**, Feb 21 2012.

CARLSEN, E. D. et al. *Leishmania amazonensis* amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms. **Infect Immun**, v. 81, n. 11, p. 3966-74, Nov 2013.

CASTANYS-MUNOZ, E. et al. *Leishmania mexicana* metacaspase is a negative regulator of amastigote proliferation in mammalian cells. **Cell Death Dis**, v. 3, p. e385, 2012.

CHOWDHURY, S. et al. Disuccinyl betulin triggers metacaspase-dependent endonuclease G-mediated cell death in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 4, p. 2186-201, Apr 2014.

COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochem J**, v. 326 (Pt 1), p. 1-16, Aug 15 1997.

COURRET, N. et al. Biogenesis of Leishmania-harboring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. **J Cell Sci**, v. 115, n. Pt 11, p. 2303-16, Jun 1 2002.

DC, D. E. O. G. et al. Intranasal immunization with LACK-DNA promotes protective immunity in hamsters challenged with *Leishmania chagasi*. **Parasitology**, v. 138, n. 14, p. 1892-7, Dec 2011.

DE FREITAS BALANCO, J. M. et al. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Curr Biol**, v. 11, n. 23, p. 1870-3, Nov 27 2001.

DE OLIVEIRA GOMES, D. C. et al. Peripheral expression of LACK-mRNA induced by intranasal vaccination with PCI-NEO-LACK defines the protection duration against murine visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 139, n. 12, p. 1562-9, Oct 2012.

DE OLIVEIRA, M. P. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: human mast cell line activation induced by logarithmic and stationary promastigote derived-lysates. **Exp Parasitol**, v. 109, n. 2, p. 72-9, Feb 2005.

DE SOUZA CARMO, E. V.; KATZ, S.; BARBIERI, C. L. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e13815, 2010.

DE TREZ, C. et al. iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania major* infection phase of C57BL/6 resistant mice. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 6, p. e1000494, Jun 2009.

DESCOTEAUX, A.; MATLASHEWSKI, G.; TURCO, S. J. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. **J Immunol**, v. 149, n. 9, p. 3008-15, Nov 1 1992.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 27, n. 5, p. 305-18, Sep 2004.

DOS SANTOS, M. S. et al. *Leishmania major*: recruitment of Gr-1+ cells into draining lymph nodes during infection is important for early IL-12 and IFN gamma production. **Exp Parasitol**, v. 119, n. 3, p. 403-10, Jul 2008.

EL-HANI, C. N. et al. Apoptosis and apoptotic mimicry in *Leishmania*: an evolutionary perspective. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, p. 96, 2012.

FADOK, V. A. et al. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. **Cell Death Differ**, v. 5, n. 7, p. 551-62, Jul 1998.

FAVALI, C. et al. Leishmania amazonensis infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. **J Leukoc Biol**, v. 82, n. 6, p. 1401-6, Dec 2007.

FELIZARDO, T. C. et al. Lack of signaling by IL-4 or by IL-4/IL-13 has more attenuating effects on Leishmania amazonensis dorsal skin--than on footpad-infected mice. **Exp Parasitol**, v. 130, n. 1, p. 48-57, Jan 2012.

FELIZARDO, T. C. et al. Leishmania (Leishmania) amazonensis infection and dissemination in mice inoculated with stationary-phase or with purified metacyclic promastigotes. **Parasitology**, v. 134, n. Pt 12, p. 1699-707, Nov 2007.

FERNANDEZ-BOTRAN, R. et al. Regulation of the production of soluble IL-4 receptors in murine cutaneous leishmaniasis. The roles of IL-12 and IL-4. **J Leukoc Biol**, v. 66, n. 3, p. 481-8, Sep 1999.

FORESTIER, C. L. et al. Imaging host cell-Leishmania interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. **Cell Host Microbe**, v. 9, n. 4, p. 319-30, Apr 21 2011.

FRANCA-COSTA, J. et al. Exposure of phosphatidylserine on Leishmania amazonensis isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36595, 2012.

FRYDMAN, J.; HOHFELD, J. Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. **Trends Biochem Sci**, v. 22, n. 3, p. 87-92, Mar 1997.

FUJIWARA, R. T. et al. Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTI1) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. **Vet Res**, v. 36, n. 5-6, p. 827-38, Sep-Dec 2005.

GANNAVARAM, S.; DEBRABANT, A. Programmed cell death in Leishmania: biochemical evidence and role in parasite infectivity. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, p. 95, 2012.

GAUR, U. et al. An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis. **J Immunol**, v. 179, n. 12, p. 8446-53, Dec 15 2007.

GHAFFARIFAR, F. et al. Enhancement of immune response induced by DNA vaccine cocktail expressing complete LACK and TSA genes against Leishmania major. **APMIS**, v. 121, n. 4, p. 290-8, Apr 2013.

GOMES, D. C. et al. Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral leishmaniasis in mice. **Vaccine**, v. 25, n. 12, p. 2168-72, Mar 8 2007.

GOMES, I. N. et al. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of Leishmania. **Microbes Infect**, v. 5, n. 4, p. 251-60, Apr 2003.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO MDE, L. [American cutaneous leishmaniasis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 1, p. 71-80, Jan-Feb 2003.

GONZALEZ, I. J. [Metacaspases and their role in the life cycle of human protozoan parasites]. **Biomedica**, v. 29, n. 3, p. 485-93, Sep 2009.

GONZALEZ, I. J. et al. Leishmania major metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 2, p. 161-72, Feb 2007.

GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G. et al. Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from Leishmania infantum. **Eur J Biochem**, v. 259, n. 3, p. 909-16, Feb 1999.

GUERIN, P. J. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 8, p. 494-501, Aug 2002.

HEINZEL, F. P. et al. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **J Exp Med**, v. 169, n. 1, p. 59-72, Jan 1 1989.

HERNANDEZ-CHINEA, C. Leishmania amazonensis: humoral response to amastigote excreted-antigens in murine leishmaniasis. **Exp Parasitol**, v. 116, n. 4, p. 492-6, Aug 2007.

HEZARJARIBI, H. Z. et al. Effect of IL-22 on DNA vaccine encoding LACK gene of Leishmania major in BALB/c mice. **Exp Parasitol**, v. 134, n. 3, p. 341-8, Jul 2013.

HONG, B. X.; SOONG, L. Identification and enzymatic activities of four protein disulfide isomerase (PDI) isoforms of Leishmania amazonensis. **Parasitol Res**, v. 102, n. 3, p. 437-46, Feb 2008.

HUGENTOBLE, F. et al. Immunization against Leishmania major infection using LACK- and IL-12-expressing Lactococcus lactis induces delay in footpad swelling. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e30945, 2012.

Jl, J. et al. Analysis of T helper cell responses during infection with Leishmania amazonensis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 66, n. 4, p. 338-45, Apr 2002.

JOSHI, P. B. et al. Targeted gene deletion in Leishmania major identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. **Mol Biochem Parasitol**, v. 120, n. 1, p. 33-40, Mar 2002.

KEDZIERSKI, L. et al. A leucine-rich repeat motif of Leishmania parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3. **J Immunol**, v. 172, n. 8, p. 4902-6, Apr 15 2004.

KELLY, B. L.; LOCKSLEY, R. M. The Leishmania major LACK antigen with an immunodominant epitope at amino acids 156 to 173 is not required for early Th2 development in BALB/c mice. **Infect Immun**, v. 72, n. 12, p. 6924-31, Dec 2004.

KELLY, B. L.; STETSON, D. B.; LOCKSLEY, R. M. Leishmania major LACK antigen is required for efficient vertebrate parasitization. **J Exp Med**, v. 198, n. 11, p. 1689-98, Dec 1 2003.

KHADEM VATAN, S.; GHARAVI, M. J.; SAKI, J. Miltefosine induces metacaspase and PARP genes expression in Leishmania infantum. **Braz J Infect Dis**, v. 15, n. 5, p. 442-8, Sep-Oct 2011.

KORCHAK, H. M.; KILPATRICK, L. E. Roles for beta II-protein kinase C and RACK1 in positive and negative signaling for superoxide anion generation in differentiated HL60 cells. **J Biol Chem**, v. 276, n. 12, p. 8910-7, Mar 23 2001.

LAINSON, R. On Leishmania enriettii and other enigmatic Leishmania species of the Neotropics. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 3, p. 377-87, May-Jun 1997.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? **Trends Microbiol**, v. 11, n. 5, p. 210-4, May 2003.

LEE, N. et al. Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite Leishmania. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 10, p. 1745-57, Oct 2007.

LIMA, H. C.; BLEYENBERG, J. A.; TITUS, R. G. A simple method for quantifying Leishmania in tissues of infected animals. **Parasitol Today**, v. 13, n. 2, p. 80-2, Feb 1997.

MADEO, F. et al. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. **Mol Cell**, v. 9, n. 4, p. 911-7, Apr 2002.

MARINHO, C. R. et al. Recrudescence of *Plasmodium berghei* from pregnant mice displays enhanced binding to the placenta and induces protection in multigravida. **PLoS One**, v. 4, n. 5, p. e5630, 2009.

MATOS, I. et al. Targeting Antigens to Dendritic Cells In Vivo Induces Protective Immunity. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e67453, 2013.

MCCONVILLE, M. J.; HANDMAN, E. The molecular basis of Leishmania pathogenesis. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 10, p. 1047-51, Aug 2007.

MCCONVILLE, M. J. et al. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **EMBO J**, v. 11, n. 10, p. 3593-600, Oct 1992.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM**, v. 107, n. 1, p. 7-14, Jan 2014.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunol Rev**, v. 201, p. 206-24, Oct 2004.

MERCER, F.; KOZHAYA, L.; UNUTMAZ, D. Expression and function of TNF and IL-1 receptors on human regulatory T cells. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8639, 2010.

MILLS, C. D. et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **J Immunol**, v. 164, n. 12, p. 6166-73, Jun 15 2000.

MOLINA, R.; GRADONI, L.; ALVAR, J. HIV and the transmission of Leishmania. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 97 Suppl 1, p. 29-45, Oct 2003.

MONTEIRO, A. C. et al. Identification, characterization and localization of chagasin, a tight-binding cysteine protease inhibitor in *Trypanosoma cruzi*. **J Cell Sci**, v. 114, n. Pt 21, p. 3933-42, Nov 2001.

MOTTRAM, J. C.; BROOKS, D. R.; COOMBS, G. H. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and Leishmania in host-parasite interactions. **Curr Opin Microbiol**, v. 1, n. 4, p. 455-60, Aug 1998.

MUKBEL, R. M. et al. Macrophage killing of Leishmania amazonensis amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **Am J Trop Med Hyg**, v. 76, n. 4, p. 669-75, Apr 2007.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The Leishmania-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 2, p. 301-8, Feb 2008.

NG, H. P. et al. Identification of macrosialin (CD68) on the surface of host macrophages as the receptor for the intercellular adhesive molecule (ICAM-L) of Leishmania amazonensis. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 14, p. 1539-50, Dec 2009.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 2, p. 293-305, Apr 2005.

PEÑA, S. M. Identificação de ligantes da metacaspase de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pela técnica de “Phage Display”. 23/11/2012. 69 folhas. Dissertação - Universidade de São Paulo, São Paulo, 23/11/2012.

PEREIRA, B. A.; BRITTO, C.; ALVES, C. R. Expression of infection-related genes in parasites and host during murine experimental infection with Leishmania (Leishmania) amazonensis. **Microb Pathog**, v. 52, n. 2, p. 101-8, Feb 2012.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970-4, Aug 15 2008.

PRINA, E. et al. Presentation of the protective parasite antigen LACK by Leishmania-infected macrophages. **J Immunol**, v. 156, n. 11, p. 4318-27, Jun 1 1996.

RAES, G. et al. Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 77, n. 3, p. 321-7, Mar 2005.

RAINA, P.; KAUR, S. Knockdown of LdMC1 and Hsp70 by antisense oligonucleotides causes cell-cycle defects and programmed cell death in Leishmania donovani. **Mol Cell Biochem**, v. 359, n. 1-2, p. 135-49, Jan 2012.

REAL, F. et al. Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. **Cell Microbiol**, v. 16, n. 10, p. 1549-64, Oct 2014.

REAL, F.; POUCHELET, M.; RABINOVITCH, M. *Leishmania* (L.) *amazonensis*: fusion between parasitophorous vacuoles in infected bone-marrow derived mouse macrophages. **Exp Parasitol**, v. 119, n. 1, p. 15-23, May 2008.

REIMAO, J. Q. et al. Parasite burden in *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*-infected mice: validation of luciferase as a quantitative tool. **J Microbiol Methods**, v. 93, n. 2, p. 95-101, May 2013.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. **J Immunol**, v. 179, n. 6, p. 3988-94, Sep 15 2007.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, p. 59, 2012.

ROLSTAD, B. The athymic nude rat: an animal experimental model to reveal novel aspects of innate immune responses? **Immunol Rev**, v. 184, p. 136-44, Dec 2001.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu Rev Microbiol**, v. 55, p. 453-83, 2001.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 11, p. 845-58, Nov 2002.

SACKS, D. L. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cell Microbiol**, v. 3, n. 4, p. 189-96, Apr 2001.

SALAY, G. et al. Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 9, p. 1173-81, Sep 2007.

SANABRIA, M. X. et al. Role of natural killer cells in modulating dendritic cell responses to *Leishmania amazonensis* infection. **Infect Immun**, v. 76, n. 11, p. 5100-9, Nov 2008.

SANCHEZ-SAMPEDRO, L. et al. High quality long-term CD4⁺ and CD8⁺ effector memory populations stimulated by DNA-LACK/MVA-LACK regimen in *Leishmania major* BALB/c model of infection. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38859, 2012.

SCHILLING, S.; GLAICHENHAUS, N. T cells that react to the immunodominant *Leishmania major* LACK antigen prevent early dissemination of the parasite in susceptible BALB/c mice. **Infect Immun**, v. 69, n. 2, p. 1212-4, Feb 2001.

SCHMIDT, J. C. et al. Characterization of TcSTI-1, a homologue of stress-induced protein-1, in *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 70-7, Feb 2011.

SCHUSTER, J. M.; NELSON, P. S. Toll receptors: an expanding role in our understanding of human disease. **J Leukoc Biol**, v. 67, n. 6, p. 767-73, Jun 2000.

SHAW, S. [Leishmaniasis]. **Tijdschr Diergeneeskd**, v. 128, n. 10, p. 320-1, May 15 2003.

SILVA, K. R. et al. Warfarin prevents venous obstruction after cardiac devices implantation in high-risk patients: partial analysis. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 23, n. 4, p. 542-9, Dec 2008.

SILVA, A. A. R. Análise funcional da proteína LRR17, rica em repetições de leucina e secretada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*. DATA. 122 Folhas. Tese - Universidade de São Paulo, São Paulo, 31/08/2011.

SILVA-ALMEIDA, M. et al. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. **Parasit Vectors**, v. 5, p. 160, 2012.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v. 31, n. 8, p. 423-31, Aug 2009.

SOONG, L. et al. Role of CD4⁺ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. **J Immunol**, v. 158, n. 11, p. 5374-83, Jun 1 1997.

SPATH, G. F. et al. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 16, p. 9536-41, Aug 5 2003.

STETSON, D. B. et al. Rapid expansion and IL-4 expression by *Leishmania*-specific naive helper T cells in vivo. **Immunity**, v. 17, n. 2, p. 191-200, Aug 2002.

STOLF, B. S. et al. Protein disulfide isomerase and host-pathogen interaction. **ScientificWorldJournal**, v. 11, p. 1749-61, 2011.

TEIXEIRA, P. C, et al. Regulation of *Leishmania (L.) amazonensis* protein expression by host cell dependent responses: differential expression on oligopeptidase B, trypanredoxin

peroxidase and HSP70 isoforms in amastigotes isolated from BALB/c and BALB/c nude mice. **PLOS Negl Trop Dis**. No prelo.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 51, n. 2, p. 229-42, Nov 2007.

TURCO, S. J. The lipophosphoglycan of Leishmania. **Subcell Biochem**, v. 18, p. 73-97, 1992.

UREN, A. G. et al. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. **Mol Cell**, v. 6, n. 4, p. 961-7, Oct 2000.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 37, p. 13837-42, Sep 12 2006.

VERCAMMEN, D. et al. Are metacaspases caspases? **J Cell Biol**, v. 179, n. 3, p. 375-80, Nov 5 2007.

VERCAMMEN, D. et al. Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of Arabidopsis thaliana cleave substrates after arginine and lysine. **J Biol Chem**, v. 279, n. 44, p. 45329-36, Oct 29 2004.

VON STEBUT, E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. **Eur J Dermatol**, v. 17, n. 2, p. 115-22, Mar-Apr 2007.

WANASEN, N.; XIN, L.; SOONG, L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine Leishmania amazonensis infection. **Int J Parasitol**, v. 38, n. 3-4, p. 417-29, Mar 2008.

WANDERLEY, J. L.; BARCINSKI, M. A. Apoptosis and apoptotic mimicry: the Leishmania connection. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 10, p. 1653-9, May 2010.

WANDERLEY, J. L. et al. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of Leishmania (L) amazonensis in mammalian hosts. **J Immunol**, v. 176, n. 3, p. 1834-9, Feb 1 2006.

WANDERLEY, J. L. et al. Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. **PLoS One**, v. 4, n. 5, p. e5733, 2009.

WEBB, J. R. et al. Molecular characterization of the heat-inducible LmSTI1 protein of *Leishmania major*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 89, n. 2, p. 179-93, Nov 1997.

WEINGARTNER, A. et al. *Leishmania* promastigotes lack phosphatidylserine but bind annexin V upon permeabilization or miltefosine treatment. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e42070, 2012.

WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Mol Microbiol**, v. 79, n. 3, p. 647-62, Feb 2011.

WIESGIGL, M.; CLOS, J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. **Mol Biol Cell**, v. 12, n. 11, p. 3307-16, Nov 2001.

WILKINS-RODRIGUEZ, A. A. et al. Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. **Exp Parasitol**, v. 126, n. 3, p. 426-34, Nov 2010.

WILLIAMS, R. A. et al. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. **Mol Microbiol**, v. 61, n. 3, p. 655-74, Aug 2006.

XIN, L.; LI, K.; SOONG, L. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. **Mol Immunol**, v. 45, n. 12, p. 3371-82, Jul 2008.

XIN, L.; LI, Y.; SOONG, L. Role of interleukin-1 β in activating the CD11c(high) CD45RB- dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*-specific CD4 $^{+}$ T cells in vitro and in vivo. **Infect Immun**, v. 75, n. 10, p. 5018-26, Oct 2007.

YAO, Y.; ZHOU, Y.; WANG, C. Both the isomerase and chaperone activities of protein disulfide isomerase are required for the reactivation of reduced and denatured acidic phospholipase A2. **EMBO J**, v. 16, n. 3, p. 651-8, Feb 3 1997.

ZALILA, H. et al. Processing of metacaspase into a cytoplasmic catalytic domain mediating cell death in *Leishmania major*. **Mol Microbiol**, v. 79, n. 1, p. 222-39, Jan

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Annu Rev Microbiol**, v. 48, p. 449-70, 1994.