

Fernando Alves de Lima Franco

**Caracterização da região genômica *META 1*
de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e
comparação com a região ortóloga de *L. (L.)*
*major***

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador:
Prof. Dra. Silvia Reni Bortolin Uliana

São Paulo
2008

RESUMO

Franco FAL. Caracterização da região *META 1* de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e comparação com a região ortóloga de *L. (L.) major* [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

A caracterização de sequências codificadoras presentes nas vizinhanças do gene *META 1* permitiu a identificação de alguns genes expressos preferencialmente em estágios infectivos de *L. (L.) amazonensis*. A comparação da região caracterizada com a ortóloga no cromossomo 17 de *L. (L.) major* revelou sintonia e altos graus de similaridade na sequência de nucleotídeos. A maior parte dos transcritos identificados é regulada de forma semelhante ao gene *META 1*, ou seja, apresentam maior abundância em promastigotas. Entretanto, um dos genes presentes é regulado de forma distinta, observando-se maior abundância do RNA em formas amastigotas. Este último gene foi denominado *LaLRR17* por codificar uma proteína de 72 kDa, contendo, em sua região central, 6 repetições ricas em leucina (LRR). As LRR são motivos presentes em diversas famílias de proteínas com diferentes funções e são responsáveis pela formação de uma estrutura capaz de estabelecer interações protéicas. A região central da proteína LRR17 apresentou similaridade com a porção carboxi-terminal da proteína NOD 3 humana. O gene *LRR17* é regulado de forma distinta durante os ciclos de vida de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major*. A proteína LRR17 foi detectada em extrato protéico de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major* e *L. (V.) braziliensis*. Em *L. (L.) amazonensis*, a proteína LRR17 foi localizada no citoplasma de promastigotas de fase estacionária, enquanto em macrófagos infectados com essa mesma espécie, a proteína está presente no citoplasma do amastigota e no citoplasma da célula hospedeira. Para caracterizar a função da proteína LRR17 foram obtidas linhagens de *L. (L.) amazonensis* expressoras do gene *LmjLRR17*. Essas linhagens mutantes foram mais infectivas em macrófagos *in vitro* quando comparadas com a linhagem selvagem, indicando assim que a proteína LRR17 pode estar interagindo com moléculas do macrófago através dos motivos LRR e

modulando a resposta celular para favorecer a sobrevivência do parasita. Avaliamos também o papel das proteínas NOD 1 e NOD 2 na infecção por *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major* para estabelecer a possível relação da proteína LRR17 na interação com essas vias de defesa celular do macrófago.

Palavras chave: *Leishmania*; Comparação genômica; Expressão gênica; Mutantes; Proteínas ricas em repetições de leucina.

ABSTRACT

Franco FAL Characterization of the *Leishmania (Leishmania) amazonensis* genomic region containing the *META 1* gene [Ph. D. thesis]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo; 2008.

The characterization of coding sequences in the vicinity of the *META 1* gene allowed the identification of some genes preferentially expressed in *L. (L.) amazonensis* infective stages. The comparison of this region with the orthologous sequences in *L. (L.) major* chromosome 17 revealed synteny and high degrees of sequence similarity. Most of the identified transcripts are stage-regulated with the same pattern of *META 1* gene, being more abundant in promastigotes. However, one of the identified transcripts presents a distinct pattern of expression with higher levels of mRNA in amastigotes. This gene was named *LaLRR17* since it encodes a 72 kDa protein with 6 leucine-rich repeats (LRR) in its central region. Leucine-rich repeats (LRR) are present in several families of proteins with different functions and are responsible for the formation of a structure capable of establishing protein interactions. The central region of the LRR17 protein showed similarity with the carboxyl-terminal portion of the NOD 3 human protein. The gene *LRR17* is regulated in different ways during the life cycles of *L. (L.) amazonensis* and *(L.) major*. The LRR17 protein was detected in *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major* and *(V.) braziliensis* promastigote protein extracts. In *L. (L.) amazonensis*, LRR17 protein was found in the cytoplasm of stationary phase promastigotes while in infected macrophages, the protein is present in amastigotes and in the host cell cytoplasm. To characterize the function of the LRR17 protein we obtained strains of *L. (L.) amazonensis* expressing the *LmjLRR17* gene. These mutant strains were more infective to macrophages *in vitro* when compared with the wild type strain, indicating that the LRR17 protein may be interacting with macrophage molecules through LRR and modulating the cellular response to increase the parasite survival. We also evaluated the role of NOD 1 and NOD 2 proteins in infections with *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) major* to investigate a possible role of the LRR17 protein in the interaction with these defense pathways in macrophages.

Keywords: *Leishmania*; Comparative genomics; Gene expression; Mutant; Leucine-rich repeat protein.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A ordem Kinetoplastida reúne um grande número de espécies de protozoários flagelados. Nesta ordem está incluída a família Trypanosomatidae representada por parasitas obrigatórios com características morfológicas muito homogêneas (Reithinger *et al.*, 2007).

Esta ordem é caracterizada pela presença de uma estrutura chamada cinetoplasto, contendo DNA (kDNA), bastante evidente ao microscópio em preparações histológicas. O cinetoplasto localiza-se na base do flagelo, posterior ao corpúsculo basal (Simpson, 1973) e representa uma região especializada da mitocôndria desses organismos (de Souza, 2008).

O kDNA é composto por aproximadamente 20 a 50 maxicírculos e milhares de minicírculos. Os maxicírculos contêm seqüências para RNAs ribossômicos e algumas proteínas, geralmente relacionadas com a transdução de energia mitocondrial. Já os minicírculos codificam pequenos “RNAs guia” que controlam a especificidade do “editing” do RNA (Sturm e Simpson, 1990; Stuart e Feagin, 1992; Lukes *et al.*, 2005).

Embora os diferentes grupos patogênicos para o homem, incluídos nos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, possuam uma organização genômica e uma estrutura celular e morfológica similar durante seu ciclo de vida, esses protozoários flagelados causam distintas patologias humanas e são transmitidos por diferentes insetos vetores (Stuart *et al.*, 2008). A multiplicação assexuada é típica, ocorrendo através de divisão binária. Entretanto, há relatos de recombinação sexual em *Trypanosoma brucei*, já em *Leishmania* isso ocorre muito raramente (Victoir e Dujardin, 2002).

As leishmanioses são doenças graves, com apresentações clínicas que podem incluir quadros assintomáticos, formas tegumentares de gravidade variável

e a forma visceral com um elevado índice de mortalidade na ausência de terapia adequada (Ashford, 2000)

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que no mundo haja aproximadamente 14 milhões de pessoas infectadas com *Leishmania* com uma incidência de 1,5 a 2 milhões de novos casos por ano, sendo 1 a 1,5 milhões da forma tegumentar da doença e 500.000 da forma visceral. Cerca de 50 milhões de pessoas vivem em áreas que apresentam risco de transmissão.

A forma tegumentar é a mais comum entre as leishmanioses sendo que as espécies mais frequentes no Mediterrâneo, Oriente Médio, Índia, África e sul da Ásia, são *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica* (Grimaldi, 1982; Reithinger *et al.*, 2007).

A infecção por *L. (L.) major* causa lesões únicas, que se curam após alguns meses e é conhecida popularmente como Botão do Oriente. Após a cura os pacientes desenvolvem proteção imune somente à reinfecção homóloga (Grimaldi, 1982).

No Brasil, os principais agentes etiológicos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) são *L. (Viannia) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* e, além dos casos com apresentação clínica clássica, estas espécies são ainda responsáveis por quadros graves e muito resistentes ao tratamento (Reithinger *et al.*, 2007).

L. (V.) braziliensis é responsável pela forma mais destrutiva da LTA, a forma cutâneo-mucosa, com lesões primárias únicas de grandes dimensões, ulceradas, que podem evoluir para a cura espontânea. Entretanto, em parte dos casos, anos após a infecção primária podem surgir lesões mucosas, em geral nasofaríngeas, destrutivas e mutilantes (Grimaldi, 1982; Laison e Shaw, 1987).

A infecção por *L. (L.) amazonensis* está relacionada à leishmaniose cutânea difusa, com uma lesão cutânea papular primária e várias lesões satélites desenvolvendo-se ao redor desta. Formas amastigotas do parasita se disseminam produzindo nódulos cutâneos múltiplos na face e extremidades do corpo (Lainson

e Shaw, 1987). Esta doença é encontrada principalmente em áreas da floresta amazônica e a infecção por este parasito vem se tornando cada vez mais freqüente pela crescente ocupação desta região (Camuset *et al.*, 2007).

A LTA é uma das infecções dermatológicas que merece mais atenção, pelo risco de deformidades que pode produzir no ser humano e pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico. Apresenta ampla distribuição com registros de casos em todas regiões brasileiras (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília-DF. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/svs> [2008 Jun 08]).

Foi observado o aumento no número de casos registrados no Brasil a partir da década de 80 com picos de transmissão a cada cinco anos. Em 1980 foram registrados 3.000 casos de LTA no Brasil. Embora tenham sido implantadas ações de controle e vigilância da LTA em 1985, em 2001 houve o registro de significativos 37.710 casos dessa doença. No período de 1985 a 2005 observou-se uma média de coeficiente de detecção de 18,5 casos/100.000 habitantes, com os coeficientes mais elevados nos anos de 1994 e 1995. Em 2003, foi confirmada a autoctonia em todos os estados brasileiros (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília-DF. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/svs> [2008 Jun 08]).

No ano de 2004 os maiores coeficientes de detecção foram observados na região que inclui o Pará, Tocantins, Manaus, Acre e Mato Grosso, sendo que o estado do Acre apresentou o maior coeficiente, 257,41/100.000 habitantes (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília-DF. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/svs> [2008 Jun 08]).

A LTA ocorre em ambos os sexos e todas as faixas etárias. Entretanto, observa-se no Brasil que 90% dos casos são em indivíduos maiores de 10 anos e

74% pertencem ao sexo masculino (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília-DF. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/svs> [2008 Jun 08]).

Insetos que pertencem à Ordem Díptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, Gênero *Lutzomya* são responsáveis pela transmissão da LTA (Bates, 2007). Esses vetores apresentam nomes populares dependendo da região geográfica brasileira, como por exemplo, mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. Muitos animais são considerados reservatórios e garantem a circulação das leishmanias na natureza, incluindo várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos e eqüídeos) (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília-DF. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/svs> [2008 Jun 08]). A transmissão de pessoa a pessoa não foi demonstrada (Bates, 2007).

Segundo o Ministério da Saúde (2007), no Brasil a LTA apresenta três padrões epidemiológicos característicos:

a) Silvestre: a transmissão ocorre em área de vegetação primária e é considerada uma zoonose de animais silvestres que pode acometer o homem ocasionalmente, quando este entra em contato com o ambiente silvestre.

b) Ocupacional e lazer: é caracterizado pela exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, usinas hidrelétricas, instalação de povoados, extração de madeira, agropecuária, treinamentos militares e ecoturismo.

c) Rural e periurbano em áreas de colonização: relacionado ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados em centros urbanos associados a matas secundárias ou residuais.

Dentre os motivos para o aumento de registros dessa doença destaca-se também o maior número de casos de leishmaniose em pacientes

imunodeprimidos que representa um grave problema de saúde pública (Herwaldt, 1999; Desjeaux, 2001). Todos esses fatores indicam que os métodos de controle, como eliminação dos reservatórios domésticos contaminados e controle peridomiciliar do vetor são ineficientes e que novas estratégias de controle são necessárias (Tesh, 1995; Modabber, 1995).

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear com duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra aflagelada ou amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (Lainson e Shaw, 1987).

O ciclo inicia-se quando o inseto vetor pica um vertebrado infectado e durante o repasto sangüíneo ingere células fagocíticas, principalmente macrófagos abrigoando formas amastigotas. Após rompimento dos macrófagos, os amastigotas no intestino do inseto assumem a forma de promastigotas procíclicos, que se multiplicam ativamente por divisão binária. Estes promastigotas, quatro ou cinco dias após o repasto, sofrem um processo de diferenciação denominado metacicloênese transformando-se então em promastigotas metacíclicos, a fase infectante para o hospedeiro vertebrado (Sacks e Perkins, 1985). Nesta fase os parasitas migram para a probóscide do inseto e quando este pica outro vertebrado sadio, inclusive o homem, introduz os promastigotas metacíclicos durante o repasto, que serão fagocitados por macrófagos do hospedeiro. Uma vez dentro da célula, os parasitas permanecem dentro do fagolisossomo onde sofrem outra transformação, originando novamente as formas amastigotas (Rey, 2001).

1.2 Arquitetura e processamento do genoma de *Leishmania ssp.*

A comparação entre os genomas de *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis*, espécies que apresentam manifestações clínicas diferentes,

identificou um alto grau de conservação entre as seqüências codificantes e sintonia entre os genes (Peacock *et al.*, 2007). Poucos dentre os genes identificados são espécie-específicos e podem estar envolvidos na diferença de virulência entre os parasitas (Peacock *et al.*, 2007). Em *L. (L.) donovani*, por exemplo, o gene A2 é fundamental para sobrevivência nos órgãos viscerais e está relacionado à patologia característica desta espécie: a forma visceral. O interessante é que em *L. (L.) major*, o gene A2 foi encontrado na forma de pseudogene (Peacock *et al.*, 2007).

Em *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum* não foi identificada a presença da maquinaria responsável por gerar diversidade no DNA, encontrada em outros eucariotos. A falta, por exemplo, de elementos de transposição favorece a estabilidade dos cromossomos (Peacock *et al.*, 2007). Em *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei* várias classes de transposons estão presentes no genoma, como os elementos LTR (“long terminal repeat”), *ingi/L1Tc*, SLACS/CZAR e os retrotransposons LTR VIPER (Peacock *et al.*, 2007). Em adição, os telômeros de *L. (V) braziliensis* contêm uma família de elementos de transposons ainda não conhecida (Peacock *et al.*, 2007).

A análise do genoma mostrou ainda que a maioria das ORFs preditas codifica proteínas com função não caracterizada e somente 3 a 4% das proteínas compreendem seqüências de aminoácidos que caracterizam domínios que podem estar potencialmente relacionados à virulência do parasita, como por exemplo, proteínas ricas em repetições de leucina [LRR-*leucine-rich repeat*] (Peacock *et al.*, 2007).

Os domínios LRR geralmente contêm 11 resíduos de aminoácidos bem conservados (LxxLxLxx^N/CXL – onde x pode ser um aminoácido qualquer, L pode também ser ocupado por valina, isoleucina e fenilalanina). Estes motivos estão presentes em várias proteínas com diversas funções e estão envolvidos em interações protéicas (Kobe e Kajava, 2001), inclusive na interação de parasitas com a célula hospedeira (Peacock *et al.*, 2007). Entretanto, poucas proteínas contendo regiões LRR em *Leishmania* já foram caracterizadas.

Com o avanço proporcionado pelo projeto genoma, estudos de microarranjos de DNA permitiram estudar a expressão global de genes em estágios específicos de *L. (L.) major*, *L. (L.) donovani* e *L. (L.) mexicana* (Brown e Botstein, 1999). Com isso, foi identificada a presença de poucos genes com expressão estágio-regulada, sendo a maioria dos genes expressos de forma constitutiva em todos os estágios de vida do parasita (Cohen-Freue *et al.*, 2007).

A expressão global de proteínas em estágios específicos de algumas espécies de *Leishmania*, como *L. (L.) infantum* (Acestor *et al.*, 2002; El Fakhry *et al.*, 2002), *L. (L.) donovani* (Bente *et al.*, 2003), *L. (L.) mexicana* (Leifso *et al.*, 2004) e *L. (V.) panamensis* (Walker *et al.*, 2006) tem sido determinada pelo estudo de proteomas (Zhang *et al.*, 2004; Domom e Aebersold, 2006). Esses estudos demonstraram que a expressão dos mRNAs determinada por análise de microarranjos de DNA não tem correlação precisa com a expressão de proteínas.

Em relação ao processamento de mRNA, a organização do genoma dos parasitas do gênero *Leishmania*, assim como de todos os membros da família Trypanosomatidae, é única entre os eucariotos (Landfear *et al.*, 1983).

A maioria dos genes estruturais estão arranjados em "tandem" (Landfear *et al.*, 1983, Thomashow *et al.*, 1983, Tschudi *et al.*, 1985) e são transcritos sob a forma de RNAs precursores policistrônicos (Johnson *et al.*, 1987; Tschudi e Ullu, 1988).

Trabalhos relatam que a transcrição se inicia nas denominadas regiões de "switch", local do cromossomo onde há mudança da fita de DNA que é transcrita. Em um cromossomo, a transcrição pode ocorrer em direções divergentes ou convergentes (Martínez-Calvillo *et al.*, 2003; Martínez-Calvillo *et al.*, 2004)

As moléculas precursoras são então processadas em mRNAs maduros pela adição de poli-A a 3' e pela adição de um pequeno RNA líder de 39 nucleotídeos (SL RNA ou mini-exon) no fenômeno conhecido como *trans*-splicing (Boothroyd e Cross 1982; Campbell *et al.*, 1984; Agabian, 1990). Como

seqüências necessárias para o “*trans*-splicing” foram definidos a presença do sítio acceptor do SL (um dinucleotídeo AG) e um trato de polipirimidinas (Huang e Van der Ploeg, 1991). A adição da cauda de poli-A ocorre a cerca de 100 a 500 nucleotídeos antecedendo o próximo AG acceptor de SL (LeBowitz *et al.*, 1993; Hartmann *et al.*, 1998).

Este tipo de transcrição e processamento faz com que os principais mecanismos de regulação de expressão ocorram em nível pós-transcricional (Aly *et al.*, 1994). As regiões não traduzidas dos mRNAs, especialmente a região 3', parecem ser responsáveis pela especificidade de expressão nos diferentes estágios do ciclo do parasita (Charest *et al.*, 1996; Beetham *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2000; Brittingham *et al.*, 2001). Vários exemplos de regulação pós transcricional podem ser citados. O processamento pode ser pela degradação do mRNA, tradução do mRNA ou por modificação e degradação da proteína (Clayton e Shapira, 2007).

1.3 A interação macrófago- *Leishmania*

1.3.1 A invasão pela forma promastigota metacíclica

A *Leishmania* é um parasita intracelular obrigatório de células fagocíticas principalmente macrófagos e células dendríticas, podendo também infectar fibroblastos e neutrófilos (Körner, Fuss e Moll, 2006). O macrófago é uma célula essencial na defesa contra patógenos invasores com importante papel na resposta imune e endocitose. Essa interação parasita-célula envolve quimiotaxia e interação de ligantes do parasita com receptores do macrófago (Basu e Ray, 2005).

A interação entre a forma promastigota metacíclica de *Leishmania* com a célula fagocítica ocorre através do glicocálix que é altamente especializado com moléculas ancoradas à membrana por meio da ligação com

uma âncora de glicofosfatidilinositol (GPI) (Naderer *et al.*, 2004). As moléculas presentes na superfície do parasita, nesta fase do ciclo, são modificadas para protegê-lo da lise pelo sistema complemento, promover a opsonização e facilitar a entrada na célula hospedeira (McConville *et al.*, 2001; McConville *et al.*, 2007).

O componente mais abundante do glicocálix da forma promastigota é o lipofosfoglicano (LPG) que na forma invasiva metacíclica apresenta o número de repetições de oligossacarídeos fosforilados duplicado e alguns constituintes alterados (McConville e Blackwell, 1991; McConville *et al.*, 1992). Essa molécula é requerida pelo parasita para sobrevivência durante a transmissão pelo vetor, protegendo-o contra o complemento e agindo como ligante para adesão ao macrófago (Naderer *et al.*, 2004). Trabalhos mostram que a infecção com *L. (L.) major* deficiente em LPG resulta na baixa sobrevivência do parasita em camundongos e atenua a virulência em macrófagos (Ilg *et al.*, 1999; Turco *et al.*, 2001). Entretanto, promastigotas de *L. (L.) mexicana* deficientes em LPG não apresentaram fenótipo alterado durante a infecção (Ilg, 2000).

A glicoproteína de superfície gp63, segunda molécula mais abundante do glicocálix, também está envolvida na entrada da forma promastigota no macrófago. Muitos autores a tem indicado como responsável pela resistência à lise pelo complemento através da clivagem do C3b em iC3b (Yao *et al.*, 2003). Linhagens mutantes super-expressoras de gp63 são mais eficientes na ligação ao macrófago comparados aos parasitas da linhagem selvagem (Liu e Chang, 1992).

Os mais importantes receptores do macrófago envolvidos na adesão e fagocitose da forma promastigota invasora são os receptores para moléculas do complemento CR₃, os receptores de manose-frutose, os receptores Fc γ RI e Fc γ RII que são importantes no reconhecimento do parasita opsonizado com um anticorpo específico, e o receptor de fibronectina (Bray, 1983).

A interação da forma metacíclica com determinados receptores do macrófago é uma estratégia utilizada pelo parasita para uma entrada “silenciosa”

na célula, inibindo a ativação de potentes microbicidas. A interação com o receptor CR₃, por exemplo, é utilizada para inibir a estimulação de intermediários de nitrogênio e oxigênio produzidos pelo macrófago, que, se ativados pela estimulação de outros receptores como por exemplo o CR1, poderiam matar o parasita (Yao *et al.*, 2003).

Na interação macrófago-*Leishmania*, após a internalização do parasita ocorre a fusão do vacúolo parasitóforo com lisossomos (Körner, Fuss e Moll, 2006). O tipo de vacúolo formado pela *Leishmania* varia de acordo com a espécie: *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) pifanoi*, por exemplo, são encontradas dentro de um largo vacúolo enquanto *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani* vivem dentro de um pequeno vacúolo. Proteofosfoglicanos, produtos secretados pelo amastigota, são relatados como as macromoléculas responsáveis pela vacuolização de macrófagos de peritônio de camundongo *in vitro*. A secreção desses glicoconjugados pelo parasita intracelular ainda facilita a expansão do vacúolo em células infectadas (Peters *et al.*, 1997).

1.3.2 O estabelecimento da infecção e a modulação da resposta imune

A forma amastigota de *Leishmania* sobrevive dentro de compartimentos lisosomais ácidos formados no macrófago. O parasita possui inúmeras estratégias para invadir e escapar do sistema de defesa celular (Bogdan *et al.*, 1990). A gp63 também presente na forma amastigota, por exemplo, é capaz de degradar as enzimas proteolíticas, protegendo o parasita da degradação pelo fagolisossomo (Bogdan *et al.*, 1990).

A ativação da produção de citocinas na célula hospedeira tem um papel crucial no estabelecimento da infecção. No modelo de infecção por *L. (L.) major* uma resposta celular Th1 está relacionada com a resistência ao parasita enquanto uma resposta celular Th2 geralmente traduz suscetibilidade à doença

(Alexander e Bryson, 2005). Estas diferenças de resposta celular estão diretamente relacionadas à ativação de fatores de transcrição envolvidos no controle da expressão de diferentes citocinas como IL-12 e TNF- α (Ji *et al.*, 2002).

O NF- κ B é um fator de transcrição de células eucariotas bastante estudado que regula a expressão de numerosos genes que participam na resposta imune e inflamatória (Schreck, 1992). Em mamíferos, proteínas desta família são compostas por 5 membros já caracterizados: c-Rel, NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65) e RelB. Estes membros estão localizados no citoplasma na sua forma inativa. Quando ativados pela fosforilação de uma proteína repressora (I κ B), formam um dímero específico os quais são translocados para o núcleo, se ligam a seqüências promotoras no DNA e induzem a expressão gênica (Baldwin, 1996).

Os dímeros formados pelos complexos p50 e RelA são os mais estudados. Certos dímeros aparentemente não existem, por exemplo, RelB dimeriza somente com p50 ou p52. A habilidade de diferentes dímeros reconhecerem diferentes seqüências de DNA aumenta a capacidade das subunidades do NF- κ B de regular a expressão de diferentes genes (Baldwin, 1996).

A ativação do fator de transcrição κ B por *Leishmania* ainda não é bem entendida e parece ser um processo molecular que varia dependendo da espécie do parasita.

Alguns autores sugerem que *Leishmania* não somente inibe a translocação do NF- κ B, mas também module a formação dos complexos que são translocados para o núcleo (Guizani-Tabbane *et al.*, 2004). Foi visto que macrófagos de linhagens U937 estimulados com PMA (phorbol-12myristate-13 acetate) a expressar o complexo p50/p65, quando infectados com formas promastigotas ou amastigotas de *L. (L.) major*, apresentam a formação do

complexo p50/c-Rel regulando a síntese de citocinas (Guizani-Tabbane *et al.*, 2004).

Formas promastigotas de *L. (L.) donovani* ativam o fator de transcrição κ B em macrófagos J774.A1 nas primeiras 12 horas de infecção (Singh *et al.*, 2004). Já um outro trabalho mostrou que macrófagos de peritônio após 24 horas de infecção com esta mesma espécie do parasita, não translocam o fator de transcrição κ B para o núcleo (Ghosh, 2002).

A modulação do NF- κ B não é uma habilidade descrita apenas pra *Leishmania*. *Toxoplasma gondii*, por exemplo, embora ative rapidamente a fosforilação do κ B, também consegue inibir a translocação do fator de transcrição κ B para o núcleo em macrófagos parasitados, favorecendo sua sobrevivência (Butcher *et al.*, 2001).

Uma outra estratégia, bastante conservada entre os organismos, utilizada pela célula para escapar do parasitismo é a morte celular programada ou apoptose, que se caracteriza pela ativação de proteases endógenas, como por exemplo, as caspases. Como resultado temos rompimento do citoesqueleto, encolhimento celular e fragmentação do DNA (Raff, 1998).

A inibição do desencadeamento de apoptose em macrófagos ou neutrófilos parasitados por *Leishmania* é considerada um importante mecanismo de evasão às defesas do hospedeiro e estabelecimento da infecção. A secreção de fatores solúveis (Moore e Matlashewski, 1994), exposição de fosfatidilserina na superfície de amastigotas (de Freitas Balanco *et al.*, 2001) ou fatores não identificados presentes no parasita vivo, mas não no sobrenadante de cultura ou em parasitas mortos (Aga *et al.*, 2002) são apontados como responsáveis por prolongar a vida da célula hospedeira e impedir a ativação de macrófagos.

Embora existam vários trabalhos relatando mecanismos de escape utilizados pela *Leishmania* não se sabe exatamente como o parasita consegue

modular essas respostas de defesa celular para favorecer sua sobrevivência no interior da célula.

A ativação e translocação do fator de transcrição NF- κ B para o núcleo, assim como a ativação da cascata apoptótica estão diretamente relacionadas com a estimulação de duas classes de receptores celulares: os receptores “Toll-Like” e os receptores NOD da família de proteínas NLR (“nucleotide-binding domain leucine-rich repeat”).

1.3.2.1 Receptores “Toll-like”

Os receptores “Toll-Like” (TLR) são proteínas transmembrana de macrófagos, células “Natural Killer”, células dendríticas e linfócitos T e B e estão presentes também na membrana dos lisosomos (Bell *et al.*, 2003). Esses receptores possuem um domínio extracelular contendo repetições ricas em leucina (LRR) e um domínio intracelular chamado de receptor Toll/IL-1 ou domínio TIR. Quando um ligante interage com a porção extracelular dos TLRs, o domínio TIR recruta moléculas adaptadoras como a MyD88 (Bell *et al.*, 2003). Esse recrutamento ativa uma série de quinases levando a fosforilação do I κ B e a conseqüente translocação do fator de transcrição κ B para o núcleo (Bell *et al.*, 2003).

A interação entre moléculas do glicocálix de *Leishmania* com os receptores “Toll-like” e o estabelecimento da resposta inflamatória têm sido bastante estudadas (Bele *et al.*, 2003).

Há trabalhos demonstrando a relação do LPG e de glicoinositol fosfolipídeos (GIPLs) com MyD88 e a ativação do NF- κ B via TLR2, embora outras moléculas também possam estar envolvidas na ativação desse receptor (de Veer *et al.*, 2003). Entretanto, foi demonstrado que o LPG não é capaz de ativar TLR4 que está diretamente envolvido no controle da infecção, possivelmente pela

regulação de iNOS, levando a síntese de NO e a morte do parasita (Debus *et al.*, 2003; Veer *et al.*, 2003). Recentemente estudos com RNA de interferência demonstraram que o TLR3 também contribui para o reconhecimento de *L. (L.) donovani* (Flandin, Chano e Descoteaux, 2006).

1.3.2.2 As proteínas da família NLR

Com o estudo intensivo dos receptores “Toll-like” (TLRs) acreditou-se, durante anos, que a resposta imune era iniciada por um sistema de proteínas de membrana com função de receptores para componentes microbiais específicos (Akira e Takeda, 2004). Esse modelo de reconhecimento e resposta, porém, não é restrito aos TLRs.

Vários patógenos intracelulares podem induzir sinais citoplasmáticos que alertam o sistema imune inato (Matzinger, 2002). Recentemente, foram descobertas várias famílias de proteínas citosólicas essenciais na ativação da resposta imune inata definidas hoje como proteínas da família NLR (ou NBD-LRR) (“HUGO Gene Nomenclature Committee”. Cambridge-UK. Disponível em: <http://www.genenames.org/genefamily/nacht.html> [2008 Jun 09]). Essas proteínas apresentam estrutura e função similares às “proteínas R” de plantas que são responsáveis por respostas de defesa contra patógenos (Dangl *et al.*, 2001). As NLRs são altamente conservadas durante a evolução com ortólogos encontrados em todo reino animal (Alder *et al.*, 2005).

As NLR também têm sido nomeadas de CATERPILLER (CARD [“caspase recruitment domain, transcription enhancer purine binding, lots of leucine repeats”]) (Harton *et al.*, 2002; Ting *et al.*, 2006), NOD (“nucleotide-binding and oligomerization domain leucine-rich repeat”) (Inohara e Nunez, 2003; Inohara *et al.*, 2006), NACHT-LRR (NAIP, CIITA, HER-E, TP-1, “leucine-rich repeat”)

(Kufer *et al.*, 2005) ou “NOD-like receptors” (nucleotide-binding and oligomerization domain) (Meylan, 2006).

As proteínas NLR são definidas por 3 domínios característicos: uma região variável amino-terminal, uma região central contendo sítios pra ligação de nucleotídeos (NBD [nucleotide-binding domain], também conhecido como domínio NACHT) (Koonin e Aravind, 2000) e uma região carboxi-terminal rica em seqüências repetitivas de leucina (leucine-rich repeats [LRRs]). Há quatro possíveis domínios amino-terminais: pirina (NLRP, conhecidos também como PAN, NALP, ou PYPAF), CARD (“caspase recruitment domain” - NLRC, conhecidos também como NOD), BIR (NAIP, “baculoviral inhibitory repeat”) ou um domínio transativador (Alder *et al.*, 2005).

A região amino-terminal tem a capacidade de recrutar moléculas efetoras, a região central (NBD) contem domínios de ligação de nucleotídeos (domínios Walker A e B), exibe atividade de ATPase e regula a oligomerização dessas moléculas, enquanto a região carboxi-terminal (LRR) está implicada na interação com o ligante específico, na maioria dos casos, moléculas (PAMPs [“pathogen-associated molecular patterns”]) provenientes de algum patógeno invasor (Kobe e Kajava, 2001).

Quando dois domínios centrais NBD ficam próximos ocorre uma dimerização, induzida pela quebra do ATP ou pela ligação da região LRR ao seu ligante específico. Com isto, os domínios amino-terminais também se aproximam e tornam-se funcionais, podendo ativar ou sinalizar a próxima proteína da cascata (Inohara *et al.*, 2002)

As proteínas NOD 1 e NOD 2 que pertencem a família NLR têm sido bastante estudadas e estão diretamente envolvidas na defesa contra patógenos intracelulares (Inohara *et al.*, 2002).

A proteína NOD 1 humana pode ser estruturalmente dividida em 3 domínios: uma região amino-terminal contendo o domínio CARD, uma região

central NBD e uma região carboxi-terminal LRR. A maior diferença estrutural entre as proteínas NOD 1 e NOD 2 é a presença de duas repetições do domínio CARD na região amino-terminal da NOD 2. Além disto, NOD 1 está presente em vários tecidos humanos enquanto NOD 2 é expressa predominantemente em monócitos e células epiteliais (Ogura *et al.*, 2001; Inohara e Nuñez, 2003).

NOD 1 e NOD 2 reconhecem peptídeos que são derivados da degradação de peptídeoglicanos (PGNs) da parede celular de bactérias. NOD 1 se liga ao peptídeo γ -D-meso-glutamil-ácido diaminopimérico (iE-DAP) (Chamaillard *et al.*, 2003; Girardin *et al.*, 2003) enquanto NOD 2 reconhece dipeptídeo muramil (MDP) (Inohara *et al.*, 2003; Girardin *et al.*, 2003). Uma vez que tanto bactérias Gram-positivas como Gram-negativas contêm MDP, NOD 2 funciona como um sensor geral de várias bactérias. Em contraste, PGNs de bactérias Gram-positivas não contêm iE-DAP, sendo assim, NOD 1 funciona como um sensor somente de bactérias Gram-negativas (Tanabe *et al.*, 2004).

A presença de mutações nessas proteínas está relacionada a diferentes doenças. Estudos genéticos mostraram que pacientes com doença de Crohn apresentavam mutações na região do gene que codifica o domínio LRR da proteína NOD 2, apresentando assim deficiência no reconhecimento de patógenos (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001). Mutações na porção NBD da proteína NOD 2 estão relacionadas à síndrome de Blau e polimorfismos na porção LRR da proteína NOD 1 foram encontrados em pacientes com asma (Miceli-Richardi *et al.*, 2001; Kanazawa *et al.*, 2005).

A dimerização de proteínas NOD 1 ou NOD 2 resulta na interação com Rip 2, uma proteína da família das quinases contendo o domínio CARD na sua região amino-terminal. Com isso ocorre a fosforilação do complexo IKK e a translocação do fator de transcrição nuclear- κ B para o núcleo (Ogura *et al.*, 2000).

Várias proteínas NLR, incluindo APAF1 (“apoptotic protease activating factor 1”) e CED-4 (“*Caenorhabditis elegans*” cell death gene-4) também são fatores reguladores da atividade de caspases, estando relacionadas à regulação

da apoptose em células de mamíferos. O mecanismo para ativação de APAF1, por exemplo, está bem caracterizado. Em resposta à demanda celular, o citocromo *c* é liberado pela mitocôndria, induzindo a oligomerização de APAF1. A dimerização da proteína resulta em recrutamento e ativação de pro-caspase-9, que tem um importante papel na indução da apoptose (Hu *et al.*, 1998).

A importância das proteínas da família NLR, incluindo as proteínas NOD 1 e NOD 2, na imunidade inata e reconhecimento de bactérias intracelulares tem sido claramente descrita pela literatura, entretanto até o momento nenhum trabalho mostrou se *Leishmania*, um parasita intracelular, consegue interagir com essas proteínas e modular a resposta de defesa celular por essas vias ou mesmo se pacientes que desenvolveram a patologia possuem algum tipo de mutação nessas proteínas.

1.4 Identificação de Fatores de Virulência em *Leishmania*

Antes das publicações de trabalhos de microarranjos de DNA que mostraram a presença de poucos genes estágio-regulados em *Leishmania*, uma das abordagens utilizadas para identificar mecanismos de infectividade e virulência era o estudo de genes com expressão em estágios infectivos do parasita (Coulson e Smith, 1990; Brodin *et al.*, 1992; Charest e Matlashewski, 1994; Siman-Tov *et al.*, 1996). Algumas das moléculas de *Leishmania* com expressão regulada parecem estar envolvidas na virulência do parasita interferindo direta ou indiretamente no controle da doença. As moléculas descritas anteriormente como a glicoproteína de superfície gp63 que apresenta regulação diferencial durante a metaciclo-gênese (Liu e Chang, 1992; Chen *et al.*, 2000; Joshi *et al.*, 2002) e a proteína A2 que é expressa na superfície da forma amastigota de *L. (L.) donovani* (Zhang e Matlashewski, 2001) são exemplos disso.

Dentre os genes expressos predominantemente em estágios infectivos já identificados está o gene *META 1*. Inicialmente caracterizado em *L. (L.) major*, este gene possui um padrão de transcrição regulada, sendo mais expresso na forma de promastigota metacíclica e está presente em outras espécies de *Leishmania* (Coulson e Smith, 1990; Nourbakhsh *et al.*, 1996).

Na tentativa de identificar o papel funcional desta proteína foram realizados experimentos de nocaute em *Leishmania*. A exclusão do primeiro alelo foi obtida por recombinação homóloga com sucesso. Entretanto, linhagens com duplo nocaute só foram obtidas na presença de um epissomo contendo uma cópia adicional do gene *META 1*. Isto indica que a proteína codificada pelo gene *META 1* é essencial, pelo menos para promastigotas. Outra abordagem usada foi obter linhagens de *L. (L.) amazonensis* super-expressoras do gene *META 1*. Estes mutantes produziram, em camundongos BALB/c, lesões cerca de 5 vezes maiores do que as produzidas pela linhagem selvagem o que indica que a proteína *META 1* apresenta um papel significativo no processo de virulência do parasita (Uliana *et al.*, 1999).

A caracterização inicial do gene *META 1* em *L. (L.) amazonensis* foi realizada através de sondagem de uma biblioteca genômica construída no cosmídio cL-Hyg (Uliana *et al.*, 1999). Os clones selecionados, quando alinhados, representam um “contig” de aproximadamente 60 kb.

Com o objetivo de identificar e caracterizar outros genes presentes nas vizinhanças do gene *META 1* de *L. (L.) amazonensis*, utilizamos o “contig” de 60 Kb de DNA genômico de *L.(L.) amazonensis* contendo o gene *META 1* em sua região central que foi mapeado e sondado com cDNA de promastigotas de fase estacionária. Vários fragmentos transcritos foram identificados e selecionados para caracterização em nosso laboratório.

Em um desses fragmentos foi identificado o gene *META 2* que também é mais expresso na forma promastigota metacíclica de *L. (L.) amazonensis*. A proteína *META 2* contém três repetições do domínio *META*, que é

definido como um domínio presente em proteínas envolvidas na mobilidade ou no choque térmico de bactérias e está presente também na proteína META 1 de *Leishmania*. A proteína META 2 foi localizada no citoplasma e na ponta do flagelo das formas promastigotas (Ramos, 2006). Foram realizados experimentos de nocaute do gene META 2. A linhagem defectiva mostrou sensibilidade aumentada a temperaturas elevadas, sugerindo que a proteína META 2 possa estar envolvida na resposta ao choque térmico (Ramos e Uliana, dados não publicados).

O mapeamento do contig contendo os genes META por hibridação com cDNA havia revelado também a presença de outros fragmentos transcritos. Nesse trabalho nós identificamos e caracterizamos novos genes com expressão em estágios infectivos do parasita. Um destes genes, localizado à 3' do gene *META 1* apresenta expressão regulada na forma amastigota de *L. (L.) amazonensis*, ou seja, na fase intracelular do hospedeiro mamífero e codifica um polipeptídeo contendo repetições ricas em leucina. Esse gene foi denominado *LRR17*.

6 CONCLUSÕES

A maioria dos genes identificados na região META 1 de *L. (L.) amazonensis* é regulado na fase promastigota do parasita;

A região META 1 de *L. (L.) amazonensis* possui um alto grau de similaridade com a região ortóloga de *L. (L.) major*;

O gene *LRR17* é regulado de forma diferencial entre *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major*;

A proteína LRR17 está presente em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major* e *L. (V.) braziliensis*;

A proteína LRR17 localiza-se no citoplasma da forma amastigota de *L. (L.) amazonensis* e no citoplasma de macrófagos infectados com essa mesma espécie;

A proteína *LmjLRR17* consegue acessar o citosol de macrófagos quando expressa em *L. (L.) amazonensis*;

A linhagem de *L. (L.) amazonensis* expressora da proteína *LmjLRR17* foi mais virulenta em infecções de macrófagos *in vitro*;

Houve maior susceptibilidade de macrófagos deficientes para genes envolvidos nas vias NOD 1 e NOD 2 à infecção por *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major* e

As linhagens de macrófagos deficientes para genes envolvidos nas vias NOD 1 e NOD 2 não apresentaram susceptibilidade à infecção pela linhagem transgênica de *L. (L.) amazonensis* expressora do gene *LmjLRR17*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acestor N, Masina S, Walker J, Saravia NG, Fasel N, Quadroni M. Establishing two-dimensional gels for the analysis of *Leishmania* proteomes. *Proteomics*. 2002;2(7):877-9.

Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Muller K, et al. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol*. 2002;169(2):898-905.

Agabian N. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell*. 1990;61(7):1157-60.

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499-511.

Alder MN, Rogozin IB, Iyer LM, Glazko GV, Cooper MD, Pancer Z. Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate. *Science*. 2005;3310(5756):1970-3.

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

Alting-Mees MA, Short JM. pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res*. 1989;17(22):9494.

Aly R, Argaman M, Halman S, Shapira M. A regulatory role for the 5' and 3' untranslated regions in differential expression of hsp83 in *Leishmania*. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22(15):2922-9.

Ashford RW. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*. 2000;30(12-13):1269-81.

Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:649-83.

Bairoch A. The PROSITE dictionary of sites and patterns in proteins, its current status. *Nucleic Acids Res*. 1993;21(13):3097-103.

Basu MK, Ray M. Macrophage and *Leishmania*: an unacceptable coexistence. *Crit Rev Microbiol*. 2005;31(3):145-54.

De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to *Biomedical Journal*: sample references. c2003 – [updated 2005 June 15; cited 2006 May 16]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 2007;37(10):1097-106.

Beetham JK, Myung KS, McCoy JJ, Wilson ME, Donelson JE. Glycoprotein 46 mRNA abundance is post-transcriptionally regulated during development of *Leishmania chagasi* promastigotes to an infectious form. *J Biol Chem.*1997;272(28):17360-6.

Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.* 2003; 24(10):528-33.

Bente M, Harder S, Wiesgigl M, Heukeshoven J, Gelhaus C, Krause E, et al. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics.* 2003;3(9):1811-29.

Besteiro S, Coombs GH, Mottram JC. A potential role for ICP, a *Leishmanial* inhibitor of cysteine peptidases, in the interaction between host and parasite. *Mol Microbiol.* 2004;54(5):1224-36.

Bogdan C, Rollinghoff M, Solbach W. Evasion strategies of *Leishmania* parasites. *Parasitol Today.* 1990;6(6):183-7.

Boothroyd JC, Cross GA. Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. *Gene* 1982;20(2):281-9.

Boucher N, Wu Y, Dumas C, Dube M, Sereno D, Breton M, et al. A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J Biol Chem.* 2002;277(22):19511-20.

Bray RS. *Leishmania mexicana mexicana*: attachment and uptake of promastigotes to and by macrophages in vitro. *J Protozool.*1983;30(2):314-22.

Brittingham A, Miller MA, Donelson JE, Wilson ME. Regulation of GP63 mRNA stability in promastigotes of virulent and attenuated *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2001;112(1):51-9.

Brodin TN, Heath S, Sacks DL. Genes selectively expressed in the infectious (metacyclic) stage of *Leishmania major* promastigotes encode a potential basic-zipper structural motif. *Mol Biochem Parasitol.*1992;52(2):241-50.

Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet.* 1999;21(1 Suppl):33-7.

Butcher BA, Kim L, Johnson PF, Denkers EY. *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. *J Immunol.* 2001;167(4):2193-201.

Cameron P, McGachy A, Anderson M, Paul A, Coombs GH, Mottram JC, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. *J Immunol.* 2004;173(5):3297-304.

Campbell DA, Thornton DA, Boothroyd JC. Apparent discontinuous transcription of *Trypanosoma brucei* variant surface antigen genes. *Nature.* 1984;311(5984):350-5.

Camuset G, Remy V, Hansmann Y, Christmann D, Gomes de Albuquerque C, Sena Casseb GA. [Mucocutaneous leishmaniasis in Brazilian Amazonia]. *Med Mal Infect.* 2007;37(6):343-6.

Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol.* 2003;4(7):702-7.

Chan MM, Bulinski JC, Chang KP, Fong D. A microplate assay for *Leishmania amazonensis* promastigotes expressing multimeric green fluorescent protein. *Parasitol Res.* 2003;89(4):266-71.

Chang KP, Reed SG, McGwire BS, Soong L. Leishmania model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop.* 2003 ;85(3):375-90.

Charest H, Matlashewski G. Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. *Mol Cell Biol.* 1994;14(5):2975-84.

Charest H, Zhang WW, Matlashewski G. The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem.* 1996;271(29):17081-90.

Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, et al. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3497-500.

Chen DQ, Kolli BK, Yadava N, Lu HG, Gilman-Sachs A, Peterson DA, et al. Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania*

amazonensis: modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages in vitro. *Infect Immun*. 2000;68(1):80-6.

Clayton C, Adams M, Almeida R, Baltz T, Barrett M, Bastien P, et al. Genetic nomenclature for *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 1998;97(1-2):221-4.

Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;156(2):93-101.

Cohen-Freue G, Holzer TR, Forney JD, McMaster WR. Global gene expression in *Leishmania*. *Int J Parasitol*. 2007;37(10):1077-86.

Conti BJ, Davis BK, Zhang J, O'Connor W, Jr., Williams KL, Ting JP. CATERPILLER 16.2 (CLR16.2), a novel NBD/LRR family member that negatively regulates T cell function. *J Biol Chem*. 2005;280(18):18375-85.

Coulson RM, Smith DF. Isolation of genes showing increased or unique expression in the infective promastigotes of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*. 1990;40(1):63-75.

Cruz AK, Titus R, Beverley SM. Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(4):1599-603.

Cruz I, Nieto J, Moreno J, Canavate C, Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res*. 2006;123(3):357-88.

Dangl JL, Jones JD. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. 2001;411(6839):826-33.

de Freitas Balanco JM, Moreira ME, Bonomo A, Bozza PT, Amarante-Mendes G, Pirmez C, et al. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol*. 2001;11(23):1870-3.

de Souza W. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. *Curr Pharm Des*. 2008;14(9):822-38.

de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, et al. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol*. 2003;33(10):2822-31.

Debus A, Glasner J, Rollinghoff M, Gessner A. High levels of susceptibility and T helper 2 response in MyD88-deficient mice infected with *Leishmania major* are interleukin-4 dependent. *Infect Immun*. 2003;71(12):7215-8.

Desjeux P, Piot B, O'Neill K, Meert JP. [Co-infections of leishmania/HIV in south Europe]. *Med Trop (Mars)*. 2001;61(2):187-93.

Di Noia JM, D'Orso I, Sanchez DO, Frasch AC. AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. *J Biol Chem*. 2000;275(14):10218-27.

Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*. 2006;312(5771):212-7.

El Fakhry Y, Ouellette M, Papadopoulou B. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics*. 2002;2(8):1007-17.

Flandin JF, Chano F, Descoteaux A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. *Eur J Immunol*. 2006;36(2):411-20.

Frazer KA, Pachter L, Poliakov A, Rubin EM, Dubchak I. VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(Web Server issue):W273-9.

Garraway LA, Tosi LR, Wang Y, Moore JB, Dobson DE, Beverley SM. Insertional mutagenesis by a modified in vitro Ty1 transposition system. *Gene*. 1997;198(1-2):27-35.

Genest PA, Haimeur A, Legare D, Sereno D, Roy G, Messier N, et al. A protein of the leucine-rich repeats (LRRs) superfamily is implicated in antimony resistance in *Leishmania infantum* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 2008;158(1):95-9.

Ghosh S, Bhattacharyya S, Sirkar M, Sa GS, Das T, Majumdar D, et al. *Leishmania donovani* suppresses activated protein 1 and NF-kappaB activation in host macrophages via ceramide generation: involvement of extracellular signal-regulated kinase. *Infect Immun*. 2002;70(12):6828-38.

Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*. 2003;278(11):8869-72.

Gregory DJ, Olivier M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology*. 2005;130 Suppl:S27-35.

Grimaldi G, Jr. [Cutaneous leishmaniasis: clinical and immunopathological aspects]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1982;77(2):195-215.

Guizani-Tabbane L, Ben-Aissa K, Belghith M, Sassi A, Dellagi K. *Leishmania major* amastigotes induce p50/c-Rel NF-kappa B transcription factor in human macrophages: involvement in cytokine synthesis. *Infect Immun*. 2004;72(5):2582-9.

Haraga A, Miller SI. A *Salmonella enterica* serovar typhimurium translocated leucine-rich repeat effector protein inhibits NF-kappa B-dependent gene expression. *Infect Immun*. 2003;71(7):4052-8.

Hartmann C, Hotz HR, McAndrew M, Clayton C. Effect of multiple downstream splice sites on polyadenylation in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 1998;93(1):149-52.

Harton JA, Linhoff MW, Zhang J, Ting JP. Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *J Immunol*. 2002;169(8):4088-93.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*. 1999;354(9185):1191-9.

Hirt RP, Harriman N, Kajava AV, Embley TM. A novel potential surface protein in *Trichomonas vaginalis* contains a leucine-rich repeat shared by micro-organisms from all three domains of life. *Mol Biochem Parasitol*. 2002;125(1-2):195-9.

Hoek M, Zanders T, Cross GA. *Trypanosoma brucei* expression-site-associated-gene-8 protein interacts with a Pumilio family protein. *Mol Biochem Parasitol*. 2002;120(2):269-83.

Hughes AL. Evolutionary relationships of vertebrate NACHT domain-containing proteins. *Immunogenetics*. 2006;58(10):785-91.

Hu Y, Ding L, Spencer DM, Nunez G. WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem*. 1998;273(50):33489-94.

Huang J, Van der Ploeg LH. Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. *EMBO J*. 1991;10(12):3877-85.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):599-603.

Ilg T. Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*. EMBO J. 2000;19(9):1953-62.

Ilg T, Montgomery J, Stierhof YD, Handman E. Molecular cloning and characterization of a novel repeat-containing *Leishmania major* gene, ppg1, that encodes a membrane-associated form of proteophosphoglycan with a putative glycosylphosphatidylinositol anchor. J Biol Chem. 1999;274(44):31410-20.

Inohara, Chamaillard, McDonald C, Nunez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. Annu Rev Biochem. 2005;74:355-83.

Inohara N, Koseki T, Lin J, del Peso L, Lucas PC, Chen FF, et al. An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. J Biol Chem. 2000;275(36):27823-31.

Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. Nat Rev Immunol. 2003;3(5):371-82.

Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nunez G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. J Biol Chem. 2001;276(4):2551-4.

Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. J Biol Chem. 2003;278(8):5509-12.

Inohara N, Ogura Y, Nunez G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. Curr Opin Microbiol. 2002;5(1):76-80.

Ivens AC, Blackwell JM. The *Leishmania* genome comes of Age. Parasitol Today. 1999;15(6):225-31.

Ji J, Sun J, Qi H, Soong L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. Am J Trop Med Hyg. 2002;66(4):338-45.

Jimenez-Ruiz A, Boceta C, Bonay P, Requena JM, Alonso C. Cloning, sequencing, and expression of the PSA genes from *Leishmania infantum*. Eur J Biochem. 1998;251(1-2):389-97.

Johnson PJ, Kooter JM, Borst P. Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. Cell. 1987;51(2):273-81.

Joshi PB, Kelly BL, Kamhawi S, Sacks DL, McMaster WR. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;120(1):33-40.

Kanazawa N, Okafuji I, Kambe N, Nishikomori R, Nakata-Hizume M, Nagai S, et al. Early-onset sarcoidosis and CARD15 mutations with constitutive nuclear factor-kappaB activation: common genetic etiology with Blau syndrome. *Blood.* 2005;105(3):1195-7.

Kedzierski L, Montgomery J, Bullen D, Curtis J, Gardiner E, Jimenez-Ruiz A, et al. A leucine-rich repeat motif of *Leishmania* parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3. *J Immunol.* 2004;172(8):4902-6.

Kelly BL, Nelson TN, McMaster WR. Stage-specific expression in *Leishmania* conferred by 3' untranslated regions of *L. major* leishmanolysin genes (GP63). *Mol Biochem Parasitol.* 2001;116(1):101-4.

Kelly JM, Das P, Tomas AM. An approach to functional complementation by introduction of large DNA fragments into *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* using a cosmid shuttle vector. *Mol Biochem Parasitol.* 1994;65(1):51-62.

Kelly JM, Ward HM, Miles MA, Kendall G. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(15):3963-9.

Kobayashi K, Inohara N, Hernandez LD, Galan JE, Nunez G, Janeway CA, et al. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature.* 2002;416(6877):194-9.

Kobe B, Kajava AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol.* 2001;11(6):725-32.

Kodukula K, Gerber LD, Amthauer R, Brink L, Udenfriend S. Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins in intact cells: specific amino acid requirements adjacent to the site of cleavage and GPI attachment. *J Cell Biol.* 1993;120(3):657-64.

Koonin EV, Aravind L. The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends Biochem Sci.* 2000;25(5):223-4.

Korner U, Fuss V, Steigerwald J, Moll H. Biogenesis of *Leishmania major*-harboring vacuoles in murine dendritic cells. *Infect Immun.* 2006;74(2):1305-12.

Kufer TA, Fritz JH, Philpott DJ. NACHT-LRR proteins (NLRs) in bacterial infection and immunity. *Trends Microbiol.* 2005;13(8):381-8.

Laban A, Tobin JF, Curotto de Lafaille MA, Wirth DF. Stable expression of the bacterial neur gene in *Leishmania enriettii*. *Nature.* 1990;343(6258):572-4.

Laban A, Wirth DF. Transfection of *Leishmania enriettii* and expression of chloramphenicol acetyltransferase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(23):9119-23.

Labeta MO, Vidal K, Nores JE, Arias M, Vita N, Morgan BP, et al. Innate recognition of bacteria in human milk is mediated by a milk-derived highly expressed pattern recognition receptor, soluble CD14. *J Exp Med.* 2000;191(10):1807-12.

Landfear SM, McMahon-Pratt D, Wirth DF. Tandem arrangement of tubulin genes in the protozoan parasite *Leishmania enriettii*. *Mol Cell Biol.* 1983;3(6):1070-6.

Lainson, R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The leishmaniasis in Biology and Medicine.* London: Academic Press; 1987. vol. 1, p. 20.

LeBowitz JH, Coburn CM, McMahon-Pratt D, Beverley SM. Development of a stable *Leishmania* expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(24):9736-40.

LeBowitz JH, Smith HQ, Rusche L, Beverley SM. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev.* 1993;7(6):996-1007.

Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol.* 2007;152(1):35-46.

Lingnau A, Domann E, Hudel M, Bock M, Nichterlein T, Wehland J, et al. Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect Immun.* 1995;63(10):3896-903.

Liu X, Chang KP. Extrachromosomal genetic complementation of surface metalloproteinase (gp63)-deficient *Leishmania* increases their binding to macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(11):4991-5.

Lodge R, Descoteaux A. *Leishmania* invasion and phagosome biogenesis. *Subcell Biochem.* 2008;47:174-81.

Lujan HD, Mowatt MR, Conrad JT, Bowers B, Nash TE. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. *J Biol Chem.* 1995;270(49):29307-13.

Lukes J, Hashimi H, Zikova A. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr Genet.* 2005;48(5):277-99.

Marino M, Braun L, Cossart P, Ghosh P. A framework for interpreting the leucine-rich repeats of the *Listeria internalins*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(16):8784-8.

Martinez-Calvillo S, Nguyen D, Stuart K, Myler PJ. Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot Cell.* 2004;3(2):506-17.

Martinez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K, Myler PJ. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell.* 2003;11(5):1291-9.

Matlashewski G. *Leishmania* infection and virulence. *Med Microbiol Immunol.* 2001;190(1-2):37-42.

Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 2002;296(5566):301-5.

Mayor C, Brudno M, Schwartz JR, Poliakov A, Rubin E M, Frazer K A, Pachter LS and Dubchak I. VISTA: Visualizing Global DNA Sequence Alignments of Arbitrary Length. *Bioinformatics.* 2000;16:1046.

McConville MJ, Blackwell JM. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J Biol Chem.* 1991;266(23):15170-9.

McConville MJ, Turco SJ, Ferguson MA, Sacks DL. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J.* 1992;11(10):3593-600.

Mengaud J, Lecuit M, Lebrun M, Nato F, Mazie JC, Cossart P. Antibodies to the leucine-rich repeat region of internalin block entry of *Listeria monocytogenes* into cells expressing E-cadherin. *Infect Immun.* 1996;64(12):5430-3.

Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature.* 2006;442(7098):39-44.

Miceli-Richard C, Lesage S, Rybojad M, Prieur AM, Manouvrier-Hanu S, Hafner R, et al. CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat Genet.* 2001;29(1):19-20.

Misslitz A, Mottram JC, Overath P, Aebischer T. Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 2000;107(2):251-61.

Modabber F. Vaccines against leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol.* 1995;89 Suppl 1:83-8.

Moore KJ, Matlashewski G. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol.* 1994;152(6):2930-7.

Mowatt MR, Lujan HD, Cotten DB, Bowers B, Yee J, Nash TE, et al. Developmentally regulated expression of a *Giardia lamblia* cyst wall protein gene. *Mol Microbiol.* 1995;15(5):955-63.

Naderer T, Ellis MA, Sernee MF, De Souza DP, Curtis J, Handman E, et al. Virulence of *Leishmania major* in macrophages and mice requires the gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(14):5502-7.

Naderer T, Vince JE, McConville MJ. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Curr Mol Med.* 2004;4(6):649-65.

Nandan D, Reiner NE. *Leishmania donovani* engages in regulatory interference by targeting macrophage protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Clin Immunol.* 2005;114(3):266-77.

Nickerson K, Sisk TJ, Inohara N, Yee CS, Kennell J, Cho MC, et al. Dendritic cell-specific MHC class II transactivator contains a caspase recruitment domain that confers potent transactivation activity. *J Biol Chem.* 2001;276(22):19089-93.

Nourbakhsh F, Uliana SR, Smith DF. Characterisation and expression of a stage-regulated gene of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996;76(1-2):201-13.

Nugent PG, Karsani SA, Wait R, Tempero J, Smith DF. Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. *Mol Biochem Parasitol.* 2004;136(1):51-62.

Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol.* 2000;302(1):205-17.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):603-6.

Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem*. 2001;276(7):4812-8.

Pays E, Tebabi P, Pays A, Coquelet H, Revelard P, Salmon D, et al. The genes and transcripts of an antigen gene expression site from *T. brucei*. *Cell*. 1989;57(5):835-45.

Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet*. 2007;39(7):839-47.

Peters C, Stierhof YD, Ilg T. Proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana amastigotes* causes vacuole formation in macrophages. *Infect Immun*. 1997;65(2):783-6.

Quijada L, Guerra-Giraldez C, Drozd M, Hartmann C, Irmer H, Ben-Dov C, et al. Expression of the human RNA-binding protein HuR in *Trypanosoma brucei* increases the abundance of mRNAs containing AU-rich regulatory elements. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(20):4414-24.

Raff M. Cell suicide for beginners. *Nature*. 1998;396(6707):119-22.

Ramos CS. Caracterização estrutural e funcional do gene *META2* de *Leishmania (L.) amazonensis* [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2006.

Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL, Ho PL. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(8):1103-9.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(9):581-96.

Revelard P, Lips S, Pays E. A gene from the VSG expression site of *Trypanosoma brucei* encodes a protein with both leucine-rich repeats and a putative zinc finger. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(24):7299-303.

Rey L. *Leishmania* e leishmaníases: os parasitos. In: Parasitologia. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 137-150.

Sacks DL, Perkins PV. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. *Am J Trop Med Hyg*. 1985;34(3):456-9.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning, a Laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor; 1989.

Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975;94(3):441-8.

Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun*. 1992;17(4):221-37.

Siman-Tov MM, Aly R, Shapira M, Jaffe CL. Cloning from *Leishmania major* of a developmentally regulated gene, c-lpk2, for the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;77(2):201-15.

Simpson L. Structure and function of kinetoplast DNA. *J Protozool*. 1973;20(1):2-8.

Singh VK, Balaraman S, Tewary P, Madhubala R. *Leishmania donovani* activates nuclear transcription factor-kappaB in macrophages through reactive oxygen intermediates. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;322(3):1086-95.

Smiley BL, Stadnyk AW, Myler PJ, Stuart K. The trypanosome leucine repeat gene in the variant surface glycoprotein expression site encodes a putative metal-binding domain and a region resembling protein-binding domains of yeast, *Drosophila*, and mammalian proteins. *Mol Cell Biol*. 1990;10(12):6436-44.

Southern EM. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 1979 ;100(2):319-23.

Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(1):9-20.

Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gurtler RE, McKerrow J, et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest*. 2008;118(4):1301-10.

Stuart K, Feagin JE. Mitochondrial DNA of kinetoplastids. *Int Rev Cytol*. 1992;141:65-88.

Sturm NR, Simpson L. Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Cell*. 1990;61(5):879-84.

Tanabe T, Chamaillard M, Ogura Y, Zhu L, Qiu S, Masumoto J, et al. Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J*. 2004;23(7):1587-97.

Tarleton RL, Kissinger J. Parasite genomics: current status and future prospects. *Curr Opin Immunol*. 2001;13(4):395-402.

Tetaud E, Lecuix I, Sheldrake T, Baltz T, Fairlamb AH. A new expression vector for *Crithidia fasciculata* and *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 2002;120(2):195-204.

Thomashow LS, Milhausen M, Rutter WJ, Agabian N. Tubulin genes are tandemly linked and clustered in the genome of *Trypanosoma brucei*. *Cell*. 1983;32(1):35-43.

Ting JP, Kastner DL, Hoffman HM. CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(3):183-95.

Tschudi C, Ullu E. Polygene transcripts are precursors to calmodulin mRNAs in trypanosomes. *EMBO J*. 1988;7(2):455-63.

Tschudi C, Young AS, Ruben L, Patton CL, Richards FF. Calmodulin genes in trypanosomes are tandemly repeated and produce multiple mRNAs with a common 5' leader sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(12):3998-4002.

Turco SJ, Spath GF, Beverley SM. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends Parasitol*. 2001;17(5):223-6.

Uliana SR, Goyal N, Freymuller E, Smith DF. *Leishmania*: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. *Exp Parasitol*. 1999;92(3):183-91.

Victoir K, Dujardin JC. How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*. *Trends Parasitol*. 2002;18(2):81-5.

Walker J, Vasquez JJ, Gomez MA, Drummelsmith J, Burchmore R, Girard I, et al. Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 2006;147(1):64-73.

Walters LL, Irons KP, Guzman H, Tesh RB. Peritrophic envelopes of *Lutzomyia spinicrassa* (Diptera: *Psychodidae*). *J Med Entomol*. 1995;32(5):711-25.

Wu Y, El Fakhry Y, Sereno D, Tamar S, Papadopoulou B. A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;110(2):345-57.

Yao C, Donelson JE, Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol.* 2003;132(1):1-16.

Zhang H, Yan W, Aebersold R. Chemical probes and tandem mass spectrometry: a strategy for the quantitative analysis of proteomes and subproteomes. *Curr Opin Chem Biol.* 2004;8(1):66-75.

Zhang WW, Matlashewski G. Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection. *Mol Microbiol.* 2001;39(4):935-48.

Zhang WW, Mendez S, Ghosh A, Myler P, Ivens A, Clos J, et al. Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection. *J Biol Chem.* 2003;278(37):35508-15.