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 Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

SÃO PAULO
2014

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 Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

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

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Velasquez, Leonardo Garcia.
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 / Leonardo Garcia Velasquez. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Modulação da expressão proteica em amastigotas de *Leishmania amazonensis* pela resposta imune do hospedeiro.

Versão do título para o inglês: Effects of the immune response in the course of infection in BALB/c, BALB/c nude and C57BL/6 and in the expression of specific proteins *in L. amazonensis* amastigotes from BALB/c and BALB/c nude.

1. *Leishmania amazonensis* 2. Linhagens murinas 3. Camundongos nude 4. Fatores de virulência 5. Expressão protéica 6. Imunologia I. Stolf, Profa. Dra. Beatriz Simonsen II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0170/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Leonardo Garcia Velasquez.

Título da Tese: 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.

Orientador(a): Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011)3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.37.09

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 001/09/CEEA datado de 12/01/09, por solicitação da Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do aluno **Leonardo Garcia Velasquez** ao projeto de pesquisa "*Expressão protéica em amastigotas de leishmania amazonensis: modulação pela resposta imune de camundongos experimentalmente infectados*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 03 de agosto de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador -CEEA- ICB/USP

Dedico essa obra à maior de todas já realizadas por mim, minha amada filha Sophia, que me incentivou ao longo dessa jornada com sua pureza e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por sempre ter estado ao meu lado ao longo dessa jornada, trazendo-me paciência, tranquilidade e abençoando-me em todos os momentos.

Aos meu familiares, que durante toda minha vida me incentivaram nos estudos e me ensinaram a nuca desistir. Agradeço por todo amor e carinho que têm por mim. Aos meus pais, João Recaredo e Nelsa, pessoas exemplares, sinônimo de caráter, honestidade e amor aos filhos. Obrigado pelo apoio e pela preocupação que sempre tiveram, principalmente durante minhas viagens para São Paulo. Aos meus irmãos, Fernanda e Guilherme e ao meu sobrinho João Francisco, obrigado pelo companheirismo e por fazerem minha vida mais feliz. Vocês são exemplos de seres humanos. Amo vocês!

De maneira especial quero agradecer minha amada sobrinha Isabella (*in memoriam)*, que me ensinou a viver a vida com felicidade e simplicidade, e me mostrou com toda sua graça e alegria que ”viver vale a pena”. Obrigado pelos momentos especiais que tivemos quando ia ao hospital visitá-la. Sinto sua falta!

A minha cunhada Paula que sempre se prontificou em colaborar com minha família durante minha ausência e, principalmente, a minha sogra Milza Aparecida, que deixou a sua casa para ajudar minha esposa nos primeiros meses de vida de minha filha, para que eu pudesse viajar com tranquilidade; deixo aqui meus sinceros agradecimentos.

Àquela que tive a honra de conhecer durante minha vida e que hoje chamo de esposa. Sou um privilegiado em tê-la ao meu lado meu amor. Você que sempre me incentivou a encarar essa dura tarefa de viagens e estudos, sem jamais perder o sorriso ou demonstrar cansaço. Você que abdicou de muitas coisas e soube, de maneira primorosa, conduzir nossa vida com maestria; foi amiga, esposa, mãe e pai, Meus eternos agradecimentos. Espero que tenha crescido como ser humano para poder lhe retribuir em vida tudo que fizeste por mim e por nossa família. Te amo!

A minha querida filha Sophia, que nasceu durante esse turbilhão e mostrou o verdadeiro valor das coisas da vida. Sua inocência, ternura e amor foram meu combustível diário e inspiração para os sonhos nas noites intermináveis dentro de um ônibus. Orgulho-me de ser

seu pai e agradeço todos os dias a Deus por tê-la colocado em minha vida e designado a responsabilidade de criá-la. Te amo minha “pequena”.

A todos os meus amigos, que estão próximos ou distantes, mas que de alguma forma sempre estiveram ao meu lado, meus sinceros agradecimentos. De maneira especial quero agradecer ao meu grande amigo e irmão, Tiago Pacanaro, que abriu as portas de sua casa para que lá eu pudesse me instalar. Não tenho palavras para expressar a gratidão que tenho por você, se um dia precisar de algo, pode contar comigo!

Obrigado a todas as pessoas do departamento de Parasitologia que direta ou indiretamente participaram da elaboração desse trabalho. De forma especial, aos meus amigos do laboratório, Maurício, pela ajuda no experimento da atividade da metacaspase, Eloiza, pela análise dos cortes histológicos, Karol, Guilherme e Patrizia. E a você Mariana, muito obrigado por ter disponibilizado boa parte do seu tempo para me ajudar diretamente com os animais e outros experimentos. Serei eternamente grato! Todos vocês são pessoas mais que especiais, pelas quais tenho imenso carinho e admiração!

Ao meu amigo Jean Pierre do departamento de Imunologia, meu muito obrigado pela ajuda nos FACs! Quem diria que um dia, após o término de nossa graduação em 2002, estaríamos em uma bancada discutindo resultados de experimentos!

Meus sinceros agradecimentos a Professora Dra. Beatriz Stolf, que abriu as portas da Universidade de São Paulo para mim e me aceitou como aluno de doutorado. Obrigado pela paciência e ensinamentos dados ao longo desses cinco anos. Você é uma pessoal especial!

Obrigado a Professora Dra. Sílvia Uliana por ter cedido a cepa MHOM/BR/1973/M2269 La-LUC para meus experimentos e por sempre ter sido atenciosa quando solicitada por mim e por suas colocações ricas em sabedoria. Agradeço também a todos do seu laboratório, que sempre se prontificaram a colaborar comigo, principalmente com o IVIS.

Agradeço a Professora Maria Irma Seixas Duarte da Faculdade de Medicina da USP pela ajuda com o experimento de histopatologia.

A Universidade Paranaense – UNIPAR – que deu a mim todas as condições para que eu pudesse realizar esse trabalho em uma cidade tão distante quanto São Paulo, minha gratidão.

Enfim, a todos aqueles que participaram de minha vida direta ou indiretamente durante esse processo, meu muito obrigado! Que Deus possa retribuir a todos derramando sobre suas bênçãos.

"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."

(Galileu Galilei)

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 sobrevida 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 numero 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 estimulo 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 idéia 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 (Parasithology) - 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, IL1β 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.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diâmetro da pata em BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados com *Leishmania amazonensis*.. 42

Figura 2 - Carga parasitária estimada pela luminescência em BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados com *Leishmania amazonensis* MHOM/BR/1973/M2269 La-LUC.. 43

Figura 3- Imagem capturada pelo IVIS dos animais após 13 semanas de infecção 43

Figura 4 - Carga parasitária em pata de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 13 semanas após a infecção com *Leishmania amazonensis* MHOM/BR/1973/M2269 La-LUC. 45

Figura 5 - Carga parasitária em linfonodo de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6, 13 semanas após a infecção com *Leishmania amazonensis* MHOM/BR/1973/M2269 La-LUC. 45

Figura 6 - Peso relativo (órgão/animal) do baço de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6, 13 semanas após a infecção com *Leishmania amazonensis* LV79.. 46

Figura 7 - Peso relativo do linfonodo poplíteo de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6, 13 semanas após a infecção com *Leishmania amazonensis* LV79. 47

Figura 8 - Expressão relativa por Real Time RT-PCR de *iNOS, IFN-γ, IL-1β e IL-4*, normalizada por GAPDH em patas infectadas de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6. . 48

Figura 9 - Expressão relativa por Real Time RT-PCR de *TGF-β, CD3e, CD68, MGL-2, IFN-γ, TNF-α, NOS, IL-4 e IL-1β*, normalizados por *GAPDH*, em baço de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados 50

Figura 10 - Expressão relativa por Real Time RT-PCR de *TGF-β, CD3e, CD68, MGL-2, IFN-γ, TNF-α, NOS, IL-4 e IL-1β*, normalizados por *GAPDH*, em linfonodo de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6, infectados.. 51

Figura 12 - Porcentagem de células mielóides e produção de citocinas em baços de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados ou não infectados (controle) com *Leishmania amazonensis* sem estímulo de PMA. 54

Figura 13 - Porcentagem de células linfóides e produção de citocinas em baços de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados ou não infectados (controle) com *Leishmania amazonensis* com estímulo de PMA. 54

Figura 14 - Porcentagem de células mielóides e produção de citocinas em baços de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados ou não infectados (controle) com *Leishmania amazonensis* com estímulo de PMA. 55

Figura 15 - Porcentagem de células linfóides em linfonodos de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados ou não infectados (controle) com *Leishmania amazonensis* sem estímulo de PMA 57

Figura 16 - Porcentagem de células lmielóides em linfonodos de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados ou não infectados (controle) com *Leishmania amazonensis* sem estímulo de PMA 58

Figura 17 - Porcentagem de células linfóides em linfonodos de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados ou não infectados (controle) com *Leishmania amazonensis* com estímulo de PMA 58

Figura 18 - Porcentagem de células mielóides em linfonodos de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados ou não infectados (controle) com *Leishmania amazonensis* sem estímulo de PMA 59

Figura 20 - Expressão de LACK e metacaspase por Western blotting em amastigotas isoladas de lesão de BALB/c e BALB/c nude 62

Figura 24 - Expressão de STI por Western blot em amastigotas isoladas de lesão de BALB/c e BALB/c nude 67

Figura 25 - Atividade tripsina-*like* em 2 µg de extrato protéico solúvel de amastigotas isoladas de BALB/c e BALB/c nude. 68

Figura 26 - Índice de infecção de macrófagos peritoneais de BALB/c sob estímulo de IFN-γ e IL-4. 70

Figura 28 - Expressão de metacaspase por Western blot em amastigotas isolados de macrófagos sob diferentes estímulos 72

Figura 29 – Análise histopatológica – perfil celular - em BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 13 semanas após a infecção com *Leishmania amazonensis* LV79.. 73

Figura 30 - Análise histopatológica – alterações teciduais - em BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6, 13 semanas após a infecção com *Leishmania amazonensis* LV79.. 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de Real-Time RT-PCR..... 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Proteína ativadora 1
BSA	Albumina sérica bovina
cm^2	Centímetro Quadrado
CaCl	Cloreto de Cálcio
cDNA	DNA complementar
CO_2	Gás carbônico
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DNAse	Desoxiribunuclease
dNTP	Desoxinucleotídeo-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
g	Grama
g/L	Grama por litro
gp63	Glicoproteína de superfície 63
h	Hora
IFN	Interferon
IFN-γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-1α	Interleucina 1 alfa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IP	Intraperotonial
KCl	Cloreto de Potássio
kDa	Kilodaltons
kDNA	DNA mitocondrial

L	Litro
L.	*Leishmania*
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
Luc	Luciferase
M	Molar
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por kilograma
mg/mL	Miligrama por mililitro
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
mM	Milimolar
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mm^2	Milímetro quadrado
mRNA	RNA mensageiro
ng/mL	Nanograma por mililitro
nm	Nanômetro
NF-κB	"Nuclear Factor kappa B"
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
PBS	Salina em tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PG_2	Prostaglandina 2
PPG	Proteofosfoglicano
rIFN-γ	Interferon gama recombinante
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa + reação em cadeia da polimerase
rTNF-α	Fator de necrose tumoral recombinante

SDS – PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SDS	Dodecil sulfato de sódio
S	Segundo
STAT-1α	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha
TEMED	N,N,N´,N´-tetrametilnodiamina
TGF-β	O Fator de transformação do crescimento beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Tris	Tris (hidroximetilaminometano)
Tris/HCl	Tris (hidroximetilaminometano) + ácido clorídrico
U/mL	Unidades por mililitro
V	Volts
x*g*	Gravidade
°C	Graus Celsius
μg	Micrograma
μg/mL	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **20**

1.1 A biologia da *Leishmania* **20**

1.2 Epidemiologia 21

1.3 Aspectos clínicos **22**

1.4 Relação Parasito Hospedeiro **23**

1.4.1 Resposta imune durante a infecção por *Leishmania* 23

1.4.2 Evasão imunológica e sobrevivência intracelular – moléculas relacionadas 25

2 OBJETIVOS **32**

2.1 Geral **32**

Comparar o perfil da infecção por *Leishmania amazonensis* em BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6, e avaliar a expressão de algumas proteínas relacionadas com virulência em amastigotas isolados de BALB/c e BALB/c nude. **32**

2.2 Etapas **32**

3 MÉTODOS **33**

3.1 Cultivo de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* 33

3.4 Extração de RNA de baço, linfonodo e patas de camundongos infectados 34

3.5 Transcrição reversa 35

3.6 Real Time RT-PCR 35

3.8 Obtenção de extrato protéico de formas promastigotas **37**

3.9 Obtenção de extrato protéico de formas amastigotas isolados de lesão **37**

3.10 SDS-PAGE 37

3.11 Western Blotting 38

3.12 Análise da atividade tripsina-like em extrato de amastigotas **38**

3.13 Infecção de macrófagos peritoneais com promastigotas na presença de IFN-γ e IL-4 ..... **39**

3.14 Obtenção de macrófagos medulares **39**

3.15 Infecção de macrófagos medulares com formas promastigotas **40**

3.16 Isolamento de formas amastigotas de macrófagos medulares e infecção dessas células com amastigotas sob estímulo de IFN-γ e/ou IL-4 ..... **40**

3.17 Análise Histopatológica 40

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 41

4.1 Evolução da infecção e da carga parasitária em diferentes tecidos por imageamento *in vivo* e diluição limitante 42

4.2 Avaliação da expressão de genes relacionados a resposta imune em pata de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 48

4.3 Avaliação da expressão de genes relacionados a resposta imune em baço de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 49

4.4 Avaliação da expressão de genes relacionados a resposta imune em linfonodo de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 51

4.5 Perfil celular e produção de citocinas em baço de BALB/c e BALB/c nude e C57BL/6 52

4.6 Perfil celular e produção de citocinas em linfonodo de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 57

4.7 Expressão de CP, LACK, LRR17, metacaspase, PDI e STI, em amastigotas isolados de BALB/c e BALB/c nude 60

4.8 Avaliação da atividade da metacaspase em amastigotas isoladas de BALB/c e BALB/c nude 68

4.9 Avaliação do efeito de IFN-γ e IL-4 na infecção de macrófagos 69

4.10 Expressão de LACK e metacaspase em amastigotas isolados de macrófagos infectados na presença de IFN-γ e IL-4 70

4.11 Avaliação histopatológica das patas dos animais infectados 73

5 CONCLUSÕES 76

REFERÊNCIAS 77

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 sobrevida 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 Lindemberg 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 de 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 guerra 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 localizadas 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 SÁUDE, 2010). O diagnóstico clínico diferencial dever se 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-β1 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-β1 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-1α 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-κB, STAT-1α 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 envolvida 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 fosfolipídio (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 H_2O_2 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-κB, 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

hábeis 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; GHAFFARIFAR et al., 2013; HEZARJARIBI et al., 2013; HUGENTOBLER 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 PSA_2 (*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 ultima 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.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Comparar o perfil da infecção por *Leishmania amazonensis* em BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6, e avaliar a expressão de algumas proteínas relacionadas com virulência em amastigotas isolados de BALB/c e BALB/c nude.

2.2 Etapas

- Avaliar a cinética da infecção em BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 durante 13 semanas;
- Determinar a carga parasitária nas patas e linfonodos infectados após 13 semanas de infecção;
- Comparar o peso do baço, linfonodo de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 após 13 semanas de infecção;
- Comparar a expressão de genes marcadores de células e citocinas nas lesões, baço e linfonodo poplíteo das três linhagens de camundongos infectados
- Determinar as porcentagens de populações celulares e citocinas produzidas por elas em linfonodo e baço de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados ou não
- Avaliar o índice de infecção em macrófagos isolados de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6;
- Avaliar a expressão de CP, LACK, LRR17, metacaspase, PDI e STI em amastigotas isolados de lesões de BALB/c e BALB/c nude após 13 semanas de infecção
- Determinar a atividade da metacaspase em amastigotas isolados de patas de BALB/c e BALB/c nude após 13 semanas de infecção
- Avaliar a expressão de LACK e metacaspase em amastigotas isolados de macrófagos infectados na presença de IFN-γ, IL-4 e IFN-γ + IL-4
- Realizar a histopatologia das patas não infectadas de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 e infectadas por *L. amazonensis* após 13 semanas de infecção

3 MÉTODOS

3.1 Cultivo de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

Promastigotas de *L. amazonensis* cepa LV79 (WHO type – MPRO/72/M1841) foram cultivados em estufa de 24° C em meio Warren completo pH 7,2 (37 g/L de Brain Heart Infusion (Difco laboratories, Franklin Lakes, Nova Jersey, Estados Unidos da América), 0,1 mg/mL de ácido fólico (Sigma, St. Lois, MO, Estados Unidos da América), 0,01 g/L de hemina (Sigma) dissolvida em NaOH 2N, autoclavado por 15 minutos a 121°C, acrescidos de 20 µg/mL de gentamicina e 10% de soro fetal bovino (SFB). A cada sete dias os parasitos foram repicados para a densidade de $2x10^6$/mL.

3.2 Determinação da carga parasitária por captura de imagem *in vivo*

Uma linhagem de *L. amazonensis* que expressa o gene da luciferase, MHOM/BR/1973/M2269 La-LUC (gentilmente cedida pela Dr. Silvia R. B. Uliana) foi utilizada para visualização *in vivo* da carga parasitária, conforme já descrito (REIMAO et al., 2013). O experimento foi realizado com 6 animais BALB/c, 6 BALB/c nude e 6 C57BL/6, infectados na parte inferior da pata com $2x10^6$ promastigotas de fase estacionária. A espessura das patas infectadas e não infectadas foram medidas semanalmente durante 13 semanas e a luminescência analisada durante o mesmo período usando o sistema IVIS Spectrum, Caliper Life Sciences. Para a avaliação da luminescência os animais foram inoculados (i.p) com 75 mg/kg VivoGlo ™ luciferina (Promega Corporation, Madison, WI, Estados Unidos da América) e após 15 minutos anestesiados em atmosfera de 2,5% de isoflurano (Cristália, São Paulo, SP, Brasil) e transferidos para a câmara de captura da imagem. Imagens foram adquiridas 21 minutos após a injeção de luciferina e os fótons emitidos quantificados usando o modo de alta resolução. A emissão de fótons total de uma região definida de interesse (ROI) que corresponde à lesão da pata foi quantificada através do software Living Image versão 4.3.1 (Caliper Life Sciences) e expressa como o número de fótons/s/ROI. O mesmo ROI foi aplicado a todos os animais.

3.3 Determinação da carga parasitária por diluição limitante

Os mesmos animais utilizados para captura de imagem foram sacrificados em câmara de CO_2 após as 13 semanas de infecção. Foram retiradas as pata com lesão e os linfonodos poplíteos, processados com bisturi e macerados em PBS com Potter. O material resultante foi mantido em gelo por 30 min. Posteriormente centrifugou-se a 50 xg por 10 min a 4 °C e recuperou-se o sobrenadante. Este foi centrifugado a 1750 xg por 25 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em PBS e lavado 3x com centrifugações a 1750 xg por 17 min a 4 °C. Após a última centrifugação os parasitos foram ressupensos em 1 mL de meio 199 e contados em Câmara de Neubauer. A partir daí foram realizadas diluições sucessivas de 1:10 (180 µL de meio 199 suplementado com 10% de SFB + 20 µg/mL de gentamicina + 20 µL da solução de parasitos) em placa de 96 poços. As placas foram incubadas por 7 dias a 25 °C para posterior verificação do último poço em que se observavam formas promastigotas (LIMA et al., 1997). A análise dos dados foi feita com o programa ELIDA (ELIDA Software Carl Tarswel).

3.4 Extração de RNA de baço, linfonodo e patas de camundongos infectados

A extração de RNA foi feita utilizando Trizol, seguindo as instruções do fabricante (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos da América). Após o período de infecção os baços, linfonodos e patas foram processados em Polytron com 1-2 mL de Trizol em temperatura ambiente (TA) e o material obtido transferido para tubos tipo eppendorf. Para cada 1mL foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio e a mistura foi rigorosamente agitada por 15 segundos e mantida em repouso por 3 minutos. Após centrifugação a 16.000 xg por 15 minutos a 4 °C a fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para outro tubo e misturada por inversões com 250 µL de isopropanol + 250 µL de uma solução 0,8M de Citrato de sódio 1,2M de NaCl. A amostra foi incubada por 10 minutos em TA e o RNA recolhido por centrifugação a 16.000 xg por 15 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado, centrifugado nas mesmas condições e seco em TA. O RNA foi ressuspenso em 10 µL de água DEPC (Life Technologies), rigorosamente agitado, aquecido por 10 minutos a 65 °C e transferido para gelo. O RNA foi quantificado por espectrofotômetro (Nanodrop - Thermo Scientific, Waltham, MA, Estado Unidos da América) no comprimento de onda de 260 nm e o grau de pureza da amostra avaliado pela relação entre as leituras a 260 e 280 nm (relação ideal en-

tre 1,8 e 2,0). A fim de se verificar a integridade do RNA e possível contaminação com RNA genômico as amostras foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 2%.

3.5 Transcrição reversa

A transcrição reversa do RNA para cDNA foi feita utilizando a enzima SuperScript^{tm} II Reverse Transcriptase (Life Technologies). A 2,0 µg de RNA adicionaram-se 50 ng de random primers, 250 ng de oligo (dT), 500 µM de dNTP (Life Technologies) em H_2O DEPC para 20 µL. Esta mistura foi aquecida por 5 minutos a 65 °C e por 2 minutos a 42 °C em termociclador. Em seguida foram adicionados 7 mM DTT, 40 U de inibidor de RNase (RNaseOUT^{TM} Recombinant Ribonuclease Inhibitor – Life Technologies), 200 U da transcriptase reversa, tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl. Essa mistura foi incubada por 50 minutos a 42° C e 15 minutos a 70°C.

3.6 Real Time RT-PCR

Empregado para comparar os níveis de mRNA dos seguintes genes: TGF-*β, CD3e, MGL-2, CD68, IFN-γ, TNF-α, iNOS, IL-4, IL-1β* e *GAPDH* nas diferentes amostras. Os primers utilizados foram desenhados pelo laboratório ou baseados em (MARINHO et al., 2009) foram os seguintes:

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de Real-Time RT-PCR.

Gene	FORWARD	REVERSE
TGF-β	5'-GGAGAGCCCTGGATACCAA -3'	5'-TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC-3'
CD3e	5'-TCTCGGAAGTCGAGGACAGT-3'	5'-ATCAGCAAGCCCAGAGTGAT-3'
MGL-2	5'-GGATCCCAAAATTCCCAGTT-3'	5'-TCCCTCTTCTCCAGTGTGCT-3'
CD68	5'-ACTCATAACCCTGCCACCAC-3'	5'-GATTTGAATTTGGGCTTGGA-3'
IFN-γ	5'-CACACTGCATCTTGGCTTTG-3'	5'-TCTGGCTCTGCAGGATTTTC-3'
TNF-α	5'-AATGGCCTCCCTCTCATCAGTT-3'	5'-CCACTTGGTGGTTTGCTACGA-3'
iNOS	5'-CACCTTGGAGTTCACCCAGT-3'	5'-ACCACTCGTACTTGGGATGC-3'
IL-4	5'-GCCTGGATTCATCGATAAGCTG-3'	5'-GAGTAATCCATTTGCATGATGCTCT-3'
IL-1β	5'-GCCCATCCTCTGTGACTCAT-3'	5'-AGGCCACAGGTATTTTGTCG-3'
GAPDH	5'-GGTCGCTGTGAACGGATTTG- 3	5'-GGGTCGTTGATGGCAACAAT - 3

As reações de PCR em tempo Real foram realizadas em triplicatas utilizando por poço 1,97 µL do cDNA diluído 1:10, oligonucleotídeos nas concentrações padronizadas, 7,6 µL de SYBR Green Mix e H2O nuclease free em quantidade suficiente para 15 µL. As condições de amplificação utilizadas foram as seguintes: 15 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 30 segundos e 68 °C por 30 segundos em equipamento Mastercycler ep Realplex – Eppendorf (Hamburgo Alemanha). A especificidade da amplificação foi confirmada pela da curva de melting usando o programa: 30 segundos a 95° C, 30 segundos a 60 °C, 15 segundos a 95 °C.

Após a determinação das concentrações ideais e das eficiências de amplificação de cada par de oligonucleotídeo, utilizamos o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para o cálculo da quantificação relativa (QR) com o gene normalizador GAPDH, pois todos os genes apresentaram eficiências em torno de 2.

QR = 2ΔΔCt, onde ΔCt = Ct alvo – Ct referência, e ΔΔCt = ΔCt amostra – ΔCt controle

3.7 Análise de populações celulares por citometria de fluxo

As células foram isoladas de baço e linfonodo poplíteo de animais infectados (13 semanas) e não infectados (com idades semelhantes). Para marcação de superfície, 10^6 células foram lavadas e ressuspensas em 25 uL de PBS pH 7,4, contendo 2% de SFB e 0,1% de azida sódica com anticorpos anti-CD4; anti-CD8; anti-CD11b e anti-CD49B (BD Pharmingen ®, Franklin Lakes, Nova Jersey, Estados Unidos da América) a 0,25 mg/mL e incubadas durante 30 min a 4 °C. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 450 xg durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi eliminado e as células ressuspensas em 400 uL de 1% de formaldeído para análise no citômetro FACSAccuri (BD Pharmingen ®). Para a marcação intracelular de IL-4, IFN-γ, IL-10 e IL-12 as amostras foram cultivadas com PMA (50 ng/mL) e ionomicina (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, Estados Unidos da América) ou sem estimulo, em presença de Brefeldina A (1 mg/mL) (BD Biosciences) durante 3-5 horas. Essas células foram lavadas e a superfície foi marcada como descrito. Após essa marcação, as células foram permeabilizadas utilizando Kit Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen ®), de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas com 50 uL de *Cytofix/Cytoperm* durante 20 minutos a 4 °C. Posteriormente foram lavadas com *Permwash* e centrifugadas a 450 xg, durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 25 uL de *Permwash* com anticorpos anti-IL-4 PE, anti-IL-10 APC, anti-IFN-γ FITC e anti-IL-12 PE (BioLegend) e incubadas durante 20 minutos a 4 °C. Após a incubação, as célu-

las foram lavadas em *Permwash* e ressuspensas em paraformaldeído a 1% para análise no citômetro de fluxo.

3.8 Obtenção de extrato protéico de formas promastigotas

Promastigotas da cepa LV79 foram contados, lavados em PBS e lisados em PBS + Proteoblock 1:100 (Fermentas®/Thermo Scientific) na proporção de 10^9 parasitos/300 μL por 8 ciclos de incubação em N2 líquido seguido de banho maria a 40 ^oC. Posteriormente foram centrifugados a 10.000 xg por 3 min a 4 ^oC, foi recuperado o extrato solúvel, e a quantificação das proteínas foi feita pelo método de Bradford (Bio-rad, Hercules, California, Estado Unidos da América).

3.9 Obtenção de extrato protéico de formas amastigotas isolados de lesão

Os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 e as patas com lesão retiradas, processadas com bisturi e maceradas com PBS em Potter. O material resultante foi mantido em gelo por 30 min. Posteriormente centrifugou-se a 50 xg por 10 min a 4 ^oC e recuperou-se o sobrenadante. Este foi centrifugado a 1750 xg por 25 min a 4 ^oC. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em PBS e lavado 3x com centrifugações de 1750 xg por 17 min a 4 ^oC. Na última centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 30 mL de meio RPMI com 4% de SFB e incubado sob agitação por 3 horas em TA. A amostra foi centrifugada a 1750 xg a 4 ^oC por 17 min e o *pellet* ressuspenso em tampão de lise de hemácias por 1 min em gelo, com posterior adição de PBS e realização de três lavagens seguidas de centrifugação a 1750 xg por 17 min a 4 ^oC. O *pellet* foi ressuspenso em 1 ml de PBS os parasitos contados. A preparação do extrato solúvel foi feita como citado em 3.9.

3.10 SDS-PAGE

O gel de separação foi feito com 12% acrilamida, 0,375 M de Tris pH 8,8, 0,1% de SDS, 0,1% de persulfato de amônio e 0,04% de TEMED. Após sua polimerização aplicou-se o gel de empilhamento contendo 5% de acrilamida, 0,125M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% de SDS, 0,1% de persulfato de amônio e 0,1% de TEMED. As amostras (10 μg) foram preparadas acrescentando-se tampão de amostra para 1x final (2,5% SDS, 0,25M Tris/HCl pH 6.8, 0,625% azul de bromofenol, 5% 2ß-mercaptoetanol, 0,625% glicerol), fervidas a 95 °C por 5 min e aplicadas nas canaletas. A eletroforese foi realizada a 60V para o gel de empilhamento

e 100V para o de separação, em tampão de corrida (25 mM de Tris-HCl, 250 mM de glicina e 0,1% de SDS).

3.11 Western Blotting

A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi realizada em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, 0,1% SDS e pH 8,2) por 1 hora a 100 V utilizando o equipamento "Mini Trans-Blot" (Bio-Rad). A membrana foi corada com o Ponceau S (0,2% Ponceau S em 5% Ác. Acético), lavada com água e bloqueada com 5% leite em pó desnatado em PBS 0,1% Tween 20 por 1 hora a TA. Após o bloqueio incubou-se com o anticorpo primário desejado (anti-CP 1:10.000 anti-LACK 1:2.500; anti-LRR17 1:1.500, anti-Metacaspase 1:200; anti-PDI 1:1.600 ou anti-STI 1:200) diluído em 2,5% leite molico em PBS 0,1% Tween 20, por 2 horas a TA. Foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos com PBS 0,1% Tween 20 seguidas de incubação com anticorpo secundário (anti-IgG de coelho – KPL (Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos da América) 1:20.000 para os anticorpos anti-LACK, anti-LRR17, anti-Metacaspase e anti-PDI; e anti-IgG de camundongo – KPL 1:100.000 para os anticorpos anti-CP e anti-STI) por 1 hora a TA. Foram realizadas duas lavagens de 10 minutos com PBS 0,1% Tween 20 e uma com PBS. A membrana foi incubada com ECL (Amersham™ ECL™ detection systems, GE, Buckinghamshire, Reino Unido) por 5 minutos e exposta a filmes de raioX. As bandas de interesse foram analisadas pelo Software ImageJ e os resultados normalizados pela intensidade da banda da proteína GAPDH. A determinação da melhor diluição a ser utilizada para cada anticorpo (primário ou secundário), assim como os tempos de incubação e lavagens foi previamente padronizada em ensaios de Western blotting utilizando-se de 10 μg extratos proteicos solúveis de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (LV79).

3.12 Análise da atividade tripsina-like em extrato de amastigotas

Para cada 2 ug de extrato protéico solúvel foram utilizados 1,5 mL de tampão para determinação de atividade tripsina-like (50 mM de Tris-HCl, 15 mM de NaCl, 5mM de Ditiotreitol - DTT pH8 e 10 mM de CaCl). Cubetas com tampão foram pré-incubadas por 1 minuto a 30,5 °C e as amostras e o substrato sintético para cisteíno-proteinases Z-Arg-Arg-AMC para 10 μM finais foram acrescidos e mantidos a 30,5 °C. A leitura foi monitorada continuamente

em fluorímetro Hitachi F-4500 com comprimento de onda de 380 nm para excitação e 460 nm para emissão. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de florescência por minuto (UAF/min).

3.13 Infecção de macrófagos peritoneais com promastigotas na presença de IFN-γ e IL-4

Macrófagos peritoneais residentes foram coletados de BALB/c e plaqueados conforme descrito no item 3.8. A infecção foi realizada com promastigotas LV79 de fase estacionária na proporção 5:1 durante 24 horas na presença de IFN-γ (R&D Systems, Mineapolis, MN, Estados Unidos da América) nas seguintes concentrações: 0,0 ng/mL; 5,9 ng/mL, 11,8 ng/mL e 23,6 ng/mL; ou na presença de IL-4 (R&D Systems): 0,0 ng/mL, 2,0 ng/mL, 5,0 ng/mL e 50 ng/mL. A montagem das lâminas e cálculo do índice de infecção foram feitos como descrito no item 3.8.

3.14 Obtenção de macrófagos medulares

Células medulares foram obtidas do fêmur de animais previamente sacrificados em câmara de CO_2. As epífises foram cortadas e os fêmures foram mergulhados em álcool 70% e lavados em PBS 1X estéril. As células foram recolhidas lavando o canal medular com 5 mL de meio R2030 (50 mL de RPMI, 30 mL de sobrenadante de cultura de fibroblasto L929 e 20 mL de Soro Fetal bovino) com uma agulha 21 G conectada a uma seringa de 5 mL. As células retiradas foram transferidas para placas de Petri de poliestireno estéril (Optilux^{TM}) e mantidas a 37 ºC, 5% de CO_2 por 7 dias. No terceiro/quarto dia foram acrescentados mais 10 mL de meio R2030 e após o sétimo dia o meio foi descartado e foram adicionados 5 mL de meio RPMI gelado sem SFB. No final dos 7 dias o meio foi descartado e os macrófagos aderidos foram incubados com meio RPMI não suplementado gelado em gelo por 15 min. Foi utilizado Cell Scraper para descolar os macrófagos, que foram centrifugados a 300 xg por 10 minutos a 4 ^{o}C e posteriormente ressuspensos em meio R105 (85 mL de RPMI, 5 mL de sobrenadante de cultura de fibroblasto L929 e 10 mL de Soro Fetal bovino) para a contagem em câmara de Neubauer e posteriormente transferidas para garrafas de cultura e mantidas por 24 horas em estufa com 5% de CO_2.

3.15 Infecção de macrófagos medulares com formas promastigotas

A infecção de macrófagos medulares com formas promastigotas de *L. amazonensis* foi realizada na proporção 10:1 (total de $2,75x10^8$ macrófagos para $2,75x10^9$ promastigotas) em meio RPMI suplementado com 20 µg/mL de gentamicina e 10% de SFB. A infecção teve duração 3 dias em estufa a 37 ^oC com atmosfera de 5% de CO_2.

3.16 Isolamento de formas amastigotas de macrófagos medulares e infecção dessas células com amastigotas sob estímulo de IFN-γ e/ou IL-4

Após os 3 dias de infecção (item 3.15) os amastigotas foram isolados dos macrófagos medulares. Para tanto, coletou-se o meio de cultura e as células aderentes foram lavadas rapidamente com PBS 1x a 37 ^oC e incubadas com 3 mL de PBS 1x 0,01% SDS a 34 ^oC por 10 min sob constante agitação. No final dessa etapa foram adicionados 3 mL de PBS acrescido de 30% de SBF. Posteriormente os macrófagos foram lisados em Potter. Os parasitos foram transferidos para o tubo contendo o sobrenadante da cultura e centrifugados a 1750 xg por 10 min. O sobrenadante foi descartado, os parasitos foram ressuspensos em meio RPMI 1640 pH 7,2 com 4% de SFB e mantidos sob agitação em TA por 3 horas (para rompimento de membranas endocíticas). Passado esse tempo foram centrifugados a 1750 xg por 10 min, ressuspensos em PBS e contados. Os amastigotas foram então utilizados para infectar novos macrófagos medulares previamente plaqueados na proporção de 5:1 parasitas:macrófago. Nessa infecção foram adotadas as seguintes condições (em triplicata) 1: macrófagos não infectados; 2: macrófagos infectados na presença de 23,6 ng/mL de IFN-γ ; 3: macrófagos infectados na presença de 50 ng/mL de IL-4 –; 4: macrófagos infectados na presença de IFN-γ e IL-4; 5: macrófagos infectados sem citocinas. A infecção teve duração de 3 dias e os amastigotas foram isolados como descrito acima. Os amastigotas foram usados para preparação de extrato proteico, como descrito no item 3.9.

3.17 Análise Histopatológica

Após os sacrifício dos animais infectados (13 semanas de infecção) e não infectados foram obtidos dos mesmos as patas, baço, linfonodo poplíteo e fígado para a análise histopatológica, no entanto somente as patas foram analisadas até o momento. O material foi cortado

em pequenos fragmentos e acondicionado em cassete para ser posteriormente parafinado e cortado em micrótomo para a obtenção dos cortes histológicos e confecção das lâminas. O processo de preparo do material (parafina, corte em micrótomo e montagem das lâminas) foi realizado pelo departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo. Após a montagem das lâminas foi realizada a leitura das mesmas. Foram avaliadas 3 lâminas, cada contendo contendo 3 cortes seriados do tecido a ser analisado. Foram adotados os seguintes parâmetros para semi quantificação: 0 (zero) - quando há ausência da célula/estrutura em questão, 1 (um) para a presença da célula/estrutura em questão, 2 (dois) para presença moderada da célula/estrutura em questão e 3 (três) para abundância da célula/estrutura em questão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Evolução da infecção e da carga parasitária em diferentes tecidos por imageamento *in vivo* e diluição limitante

Camundongos BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 foram infectados na pata esquerda com formas promastigotas de *L. amazonensis*. Ao longo de 13 semanas foram feitas medidas da espessura das patas infectadas e não infectadas, e as espessuras das lesões são mostrados na figura 1. Foi observado que em C57BL/6 e BALB/c houve aumento da espessura mais precocemente do que em BALB/c nude. Em C57BL/6 a espessura da pata apresentou o pico entre a sexta e sétima semanas e posteriormente regrediu, tornando-se significativamente menor do que as dos demais (figura 1). Em BALB/c e BALB/c nude observou-se aumento do diâmetro até o término das 13 semanas, sendo que a espessura das patas infectadas em BALB/c foram sempre maiores do que em BALB/c nude. A análise da área sob a curva de espessura da pata mostrou que as patas de BALB/c aumentaram mais que as de BALB/c nude e C57BL/6 e as de BALB/c nude mais que as de C57BL/6. No final das 13 semanas os animais foram sacrificados.

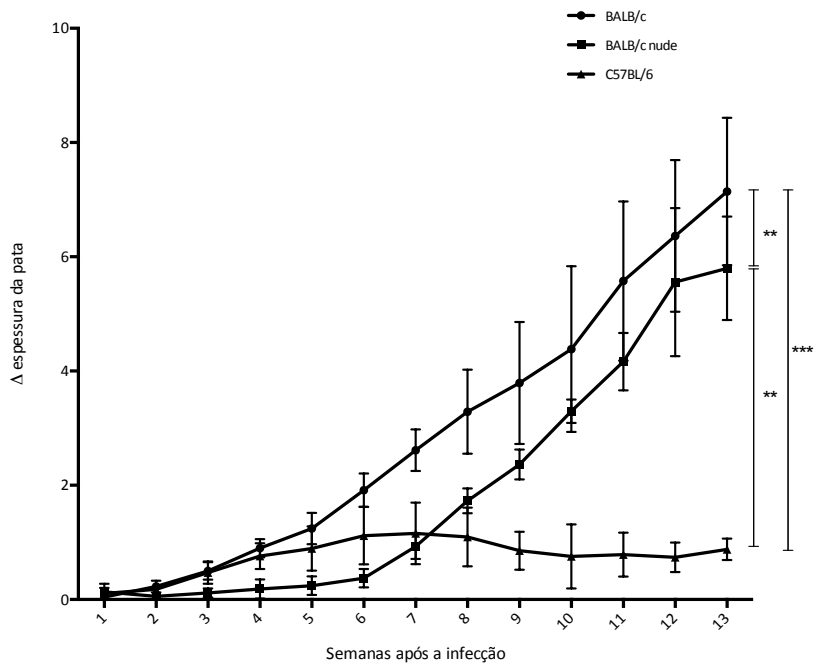

Figura 1 – Diâmetro da pata em BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados com *Leishmania amazonensis*. (diferença entre patas infectadas e não-infectadas) durante 13 semanas de infecção de 15 animais. Análise estatística por ANOVA. * = p <0,05, ** = p <0,01, *** = p <0,001 a partir da área sob a curva (AUC).

Resultados semelhantes foram verificados no ensaio da avaliação da carga parasitária realizado por bioluminescência (Figuras 2 e 3).

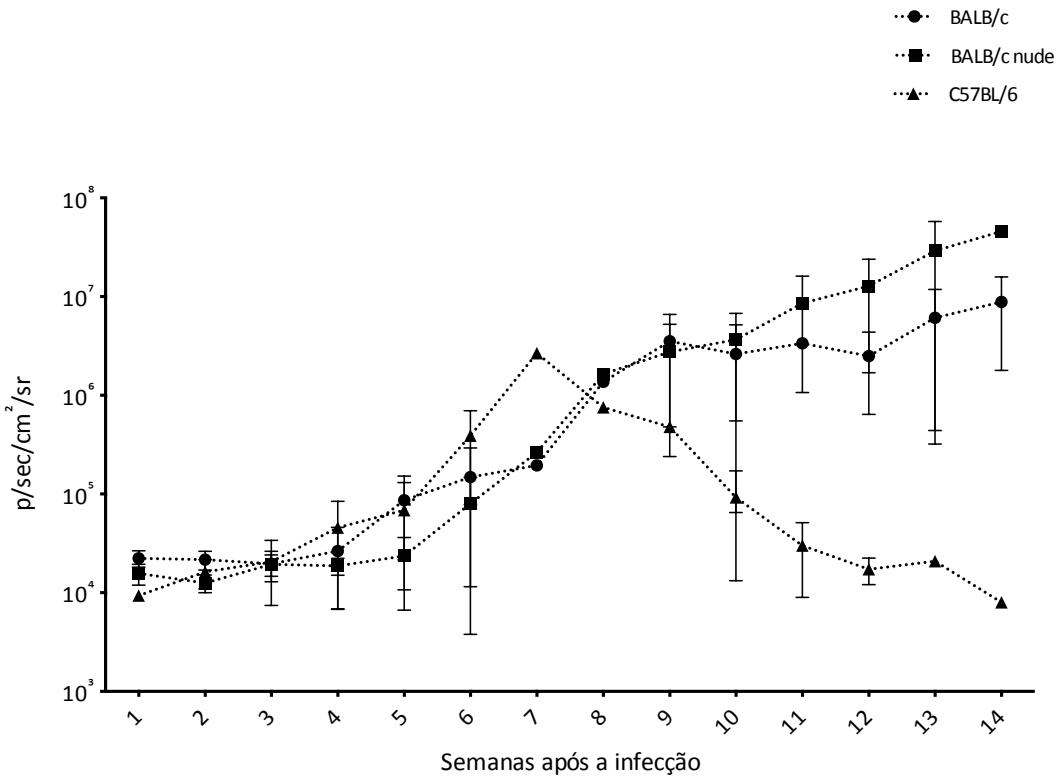

Figura 2 - Carga parasitária estimada pela luminescência em BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 (6, 4 e 6 animais, respectivamente) infectados com *Leishmania amazonensis* MHOM/BR/1973/M2269 La-LUC. Análises estatísticas por ANOVA. * = p ≤ 0,05, a partir da área sob a curva (AUC).

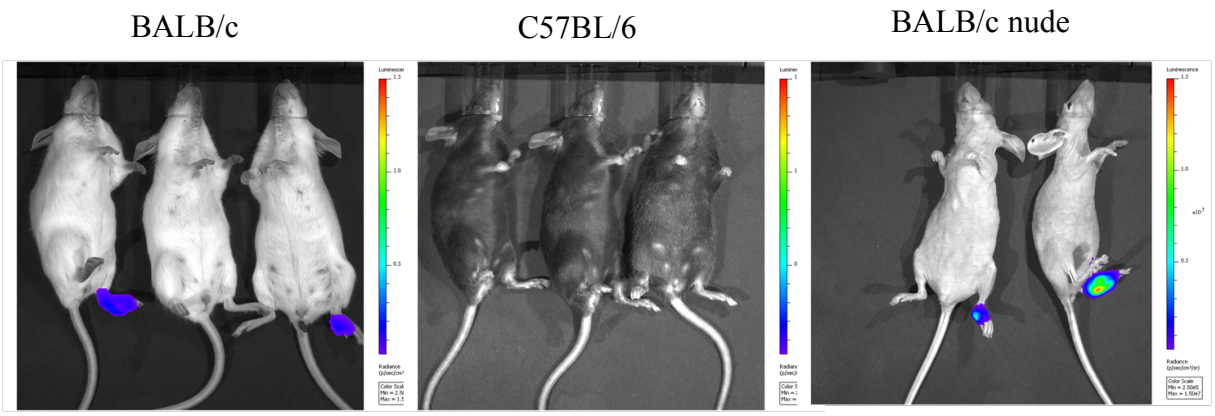

Figura 3- Imagem capturada pelo IVIS dos animais após 13 semanas de infecção

Nesse experimento não houve diferença na carga parasitária estimada pela luminescência entre os animais até o final da décima terceira semana. Assim como observado na espessura da pata (figura 1) houve um pico de luminescência na sexta semana com posterior queda até ao final das 13 semanas. Em BALB/c e BALB/c nude, conforme observado na medida da espessura das patas, a luminescência continuou a aumentar até o final das 13 semanas, quando os animais foram sacrificados para o isolamento de amastigotas de lesão, baço e linfonodo para a realização da determinação da carga parasitária pelo método da diluição limitante. No entanto, contrariamente à medida de espessura, em BALB/c não foi observada maior luminescência do que em BALB/c nude e C57BL/6. Ressalta-se nesse experimento que a análise da área sob a curva das três linhagens mostrou-se ser semelhante ao longo das 13 semanas (Figura 2).

A menor espessura das patas infectadas em BALB/c nude deve-se à reduzida resposta inflamatória nesses animais, que está diretamente relacionada com a deficiência de linfócitos T CD4, responsáveis pelo recrutamento de células ao local da infecção (SOONG et al., 1997).

A regressão da lesão observada em C57BL/6 já havia sido relatada em outros estudos comparando a infecção em C57BL/6 e BALB/c (FELIZARDO et al., 2007). Na primeira linhagem foram observadas regressão da lesão e menor carga parasitária, no entanto o parasito não era erradicado completamente (FELIZARDO et al., 2007). Em nosso estudo observamos uma regressão da lesão a partir da sétima semana, com redução total da espessura ao final de 13 semanas. No entanto, parasitos ainda foram encontrados nas patas infectadas, como será mostrado na figura 4, corroborando o que havia sido mostrado anteriormente.

A avaliação da carga parasitária por emissão de luminescência pela utilização de patógenos transgênicos que expressam luciferase é uma ferramenta de grande valia, já que possibilita a análise da infecção *in vivo* em tempo real (BEATTIE et al., 2008). Com essa tecnologia é possível mapear toda a evolução da infecção por *Leishmania* sem a necessidade da utilização de um grande número de animais. Essa técnica já havia sido validada com a finalidade de se acompanhar a carga parasitária de *L. amazonensis* em ensaios que avaliaram a eficácia de novas drogas (REIMAO et al., 2013).

Além da avaliação da espessura da pata e determinação da carga parasitária por emissão de luminescência, também foi realizada a quantificação de parasitos em pata e linfonodo poplíteo no final das 13 semanas pelo método da diluição limitante. Os dados são apresentados nas figuras 4 e 5.

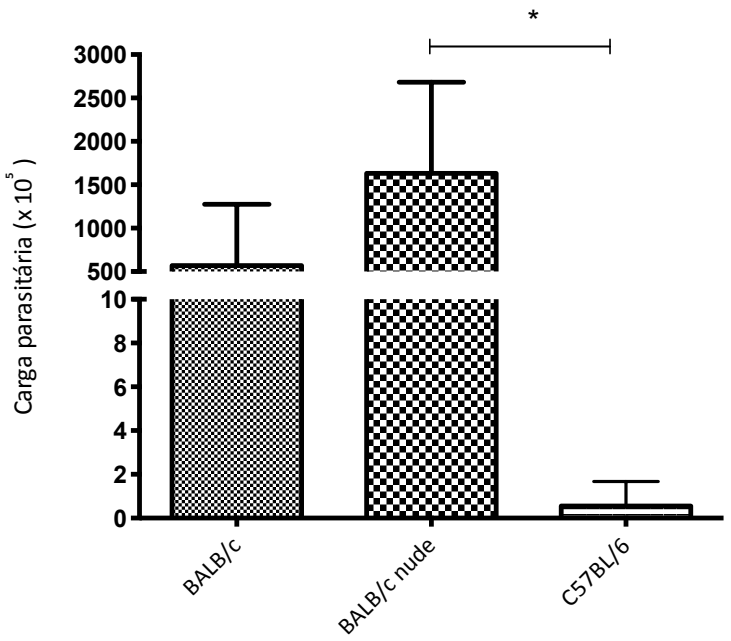

Figura 4 - Carga parasitária em pata de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6. (6, 4 e 5 animais, respectivamente) 13 semanas após a infecção com *Leishmania amazonensis* MHOM/BR/1973/M2269 La-LUC. Análises estatísticas por ANOVA. * = $p \leq 0,05$

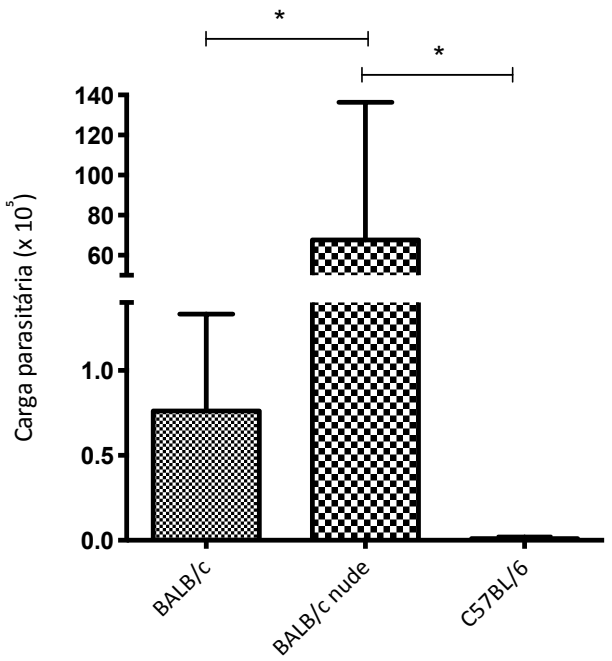

Figura 5 - Carga parasitária em linfonodo de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6. (6, 4 e 5 animais, respectivamente) 13 semanas após a infecção com *Leishmania amazonensis* MHOM/BR/1973/M2269 La-LUC. Análises estatísticas por ANOVA. * = $p \leq 0,05$

Nas patas observamos que BALB/c nude apresentaram mais parasitos que BALB/c e C57BL/6, embora essa diferença seja significativa somente em relação ao C57BL/6 (Figura 4). Já nos linfonodos, o número de parasitos foi significativamente maior em BALB/c nude do que em BALB/c e C57BL/6 (Figura 5). A maior carga parasitária em BALB/c nude pode ser atribuída a imunodeficiência desses animais, o que favorece a proliferação dos parasitos. Em infecção realizada em C57BL/6 nude não foi observado aumento da espessura das patas durante as 20 primeiras semanas de infecção (SOONG et al., 1997). Tal fato difere do encontrado por nós na infecção em BALB/c nude, apesar de ambos animais apresentarem imunodeficiência. As diferenças entre os dois trabalhos podem ser atribuídas a diferenças na linhagem murina, carga parasitária do inóculo, cepa do parasito e/ou local da infecção (SOONG et al., 1997).

Além da carga parasitária, também analisamos o peso relativo de baço e linfonodo de animais infectados ou não, pois infecções por espécies de *Leishmania* que causam doenças cutâneas podem aumentar linfonodos drenantes da lesão (AGUILAR TORRENTERA et al., 2002; WANASEN et al., 2008) Os dados são mostrados nas figuras 6 e 7.

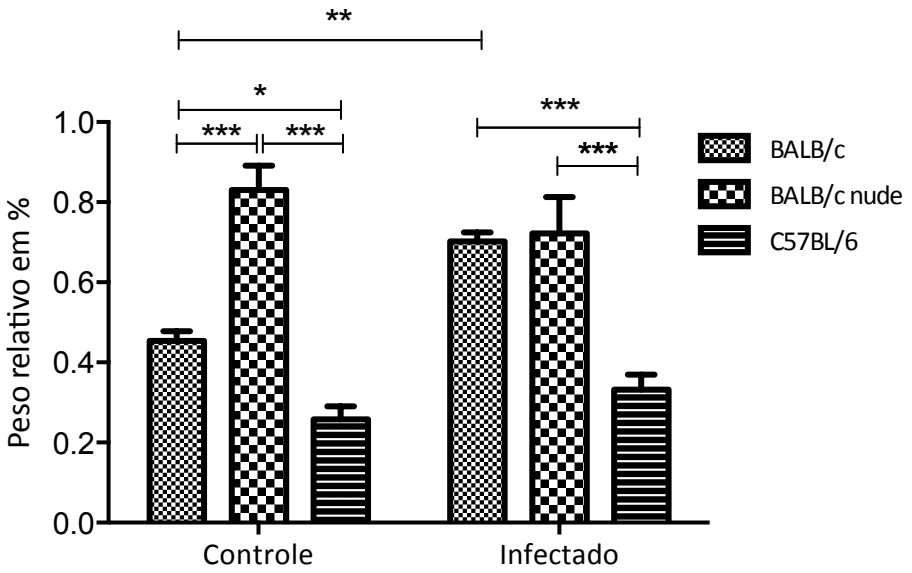

Figura 6 - Peso relativo (órgão/animal) do baço de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 (5 animais de cada) 13 semanas após a infecção com *Leishmania amazonensis* LV79. Análises estatísticas por ANOVA. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

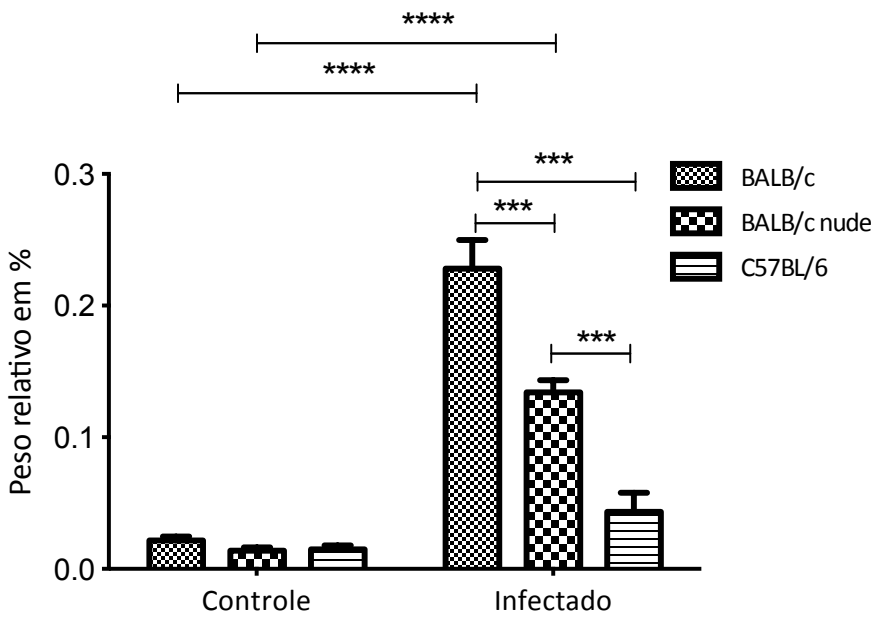

Figura 7 - Peso relativo do linfonodo poplíteo de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 (5 animais de cada) 13 semanas após a infecção com *Leishmania amazonensis* LV79. Análises estatísticas por ANOVA. * = p ≤ 0,05, ** = p ≤ 0,01 e *** = p ≤ 0,001.

Na figura 6 verificamos que nos animais do grupo controle houve diferença no peso relativo do baço entre BALB/c nude e BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 e BALB/c e C57BL/6. Após 13 semanas de infecção houve um aumento em BALB/c. Acreditamos que o controle da infecção em C57BL/6 fez com que o peso do baço nessa linhagem não aumentasse como nos BALB/c, nos quais o constante estímulo gerado pela presença e proliferação dos parasitos promoveu o aumento do baço até o momento do sacrifício. Em BALB/c nude a deficiência de células T parece comprometer o recrutamento de células e consequentemente o aumento do órgão.

Com relação aos linfonodos, observamos pesos relativos semelhantes nos animais controle e aumento de aproximadamente dez vezes em BALB/c e BALB/c nude e de apenas três vezes em C57BL/6 após a infecção. Acreditamos que BALB/c e nude tiveram maior aumento porque após 13 semanas de infecção as lesões ainda apresentam crescimento em termos de parasitas e espessura, o que leva ao recrutamento de células ao linfonodo drenante. A regressão das lesões em C57BL/6 resulta em pouco recrutamento de células aos linfonodos nessa linhagem.

Já havia sido relatado que linfonodos de BALB/c infectados com *L. amazonensis* continham 6,5 vezes mais células do que os controles, enquanto que em C3H esse aumento

não passava de 2,5 vezes (WANASEN et al., 2008). Diferentemente de nossos resultados, em infecção com *L. mexicana* não foi observada diferença nos linfonodos de BALB/c e C57BL/6 até 14 semanas de infecção, e os linfonodos de BALB/c aumentaram após esse período (AGUILAR TORRENTERA et al., 2002). Essas discrepâncias são provavelmente devidas a diferenças na virulência das cepas/espécies usadas.

4.2 Avaliação da expressão de genes relacionados a resposta imune em pata de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6

A expressão dos genes *iNOS, IFN-γ, IL-4* e *IL-1β* foi analisada nas patas de animais BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 após 13 semanas de infecção por Real-Time RT (Figura 8).

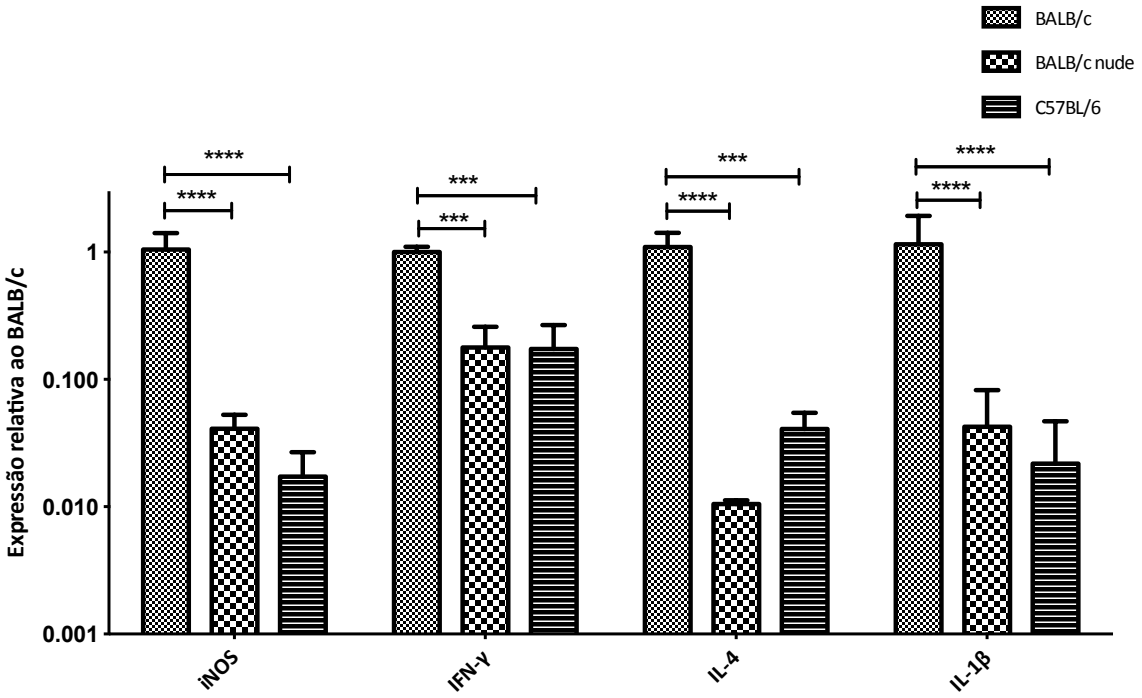

Figura 8 - Expressão relativa por Real Time RT-PCR de *iNOS, IFN-γ, IL-1β e IL-4*, normalizada por GAPDH em patas infectadas de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 (3, 4, 4 animais respectivamente). Análise estatística por ANOVA. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; $p \leq 0,0001$.

Como pode ser observado na figura 8 houve significativamente maior expressão dos quatro genes em BALB/c quando comparado com os demais animais. Entre BALB/c nude e C57BL/6 não diferença em nenhum dos genes.

A expressão concomitante de genes como *IL-4* e *IFN-γ* em BALB/c mostra que na pata desses animais, no final das 13 semanas, há um perfil de reposta imune com padrão mis-

to. Já é sabido que camundongos infectados por *L. amazonensis* não apresentam polarização de reposta imune como ocorre em infecções por *Leishmania major* (JI et al., 2002; TRIPATHI et al., 2007). Dessa forma, citocinas que caracterizam um perfil Th2 como a IL-4 e um perfil Th1, como o INF-γ são expressas simultaneamente. Possivelmente esse seja um dos motivos do diferente curso de infecção observado em animais quando infectados por *L. amazonensis* em comparação com *L. major* (JI et al., 2002). Além disso, a maior expressão de *iNOS, IFN-γ, IL-4* e *IL-1β* em BALB/c é compatível com maior recrutamento de células e infecção ativa nessa linhagem, o que justifica a maior espessura das patas (figura 1) quando comparada aos demais animais.

Os menores níveis de expressão desse genes em BALB/c nude deve-se ao pequeno numero de linfócitos T. A expressão de *IFN-γ* e *iNOS* semelhante entre nude e C57BL/6 poderia ser atribuída a presença de células NK, que apresentam importante atividade citotóxica, sendo fundamentais em animais onde a concentração de células T é baixa (ROLSTAD, 2001). ativação de dessas células pode ser responsável pela expressão relativamente elevada de iNOS em BALB/c nude (BOEHM et al., 1997). Um outro fator que pode ser responsável pela expressão semelhante dos quatro genes em C57BL/6 e BALB/c nude, menor do que os de BALB/c, é o controle da carga parasitária em C57BL/6 a partir da sexta semana de infecção (figura 1). Como nesse experimento foi avaliada a expressão dos genes ao término da décima terceira semana, a resposta à infecção estaria provavelmente bastante reduzida. Um exemplo que reforça essa hipótese é o da *IL-1β*. Já é sabido que a *IL-1β* é produzida especialmente por monócitos, macrófagos, células dendríticas (BARTON, 2008), e que parasitos têm a capacidade de modular a produção dessa citocina por células dendríticas (XIN et al., 2008). A menor quantidade de parasitas nas patas de C57BL/6 levaria a um menor recrutamento de monócitos/macrófagos e menor estimulação de células dendríticas, acarretando, então, menor expressão de *IL-1β*.

4.3 Avaliação da expressão de genes relacionados a resposta imune em baço de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6

Além da avaliação da expressão de genes nas patas infectadas, também foram avaliados alguns genes relacionados a populações celulares e perfil de reposta imune no baço de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados. Os resultados são mostrados na figura 9.

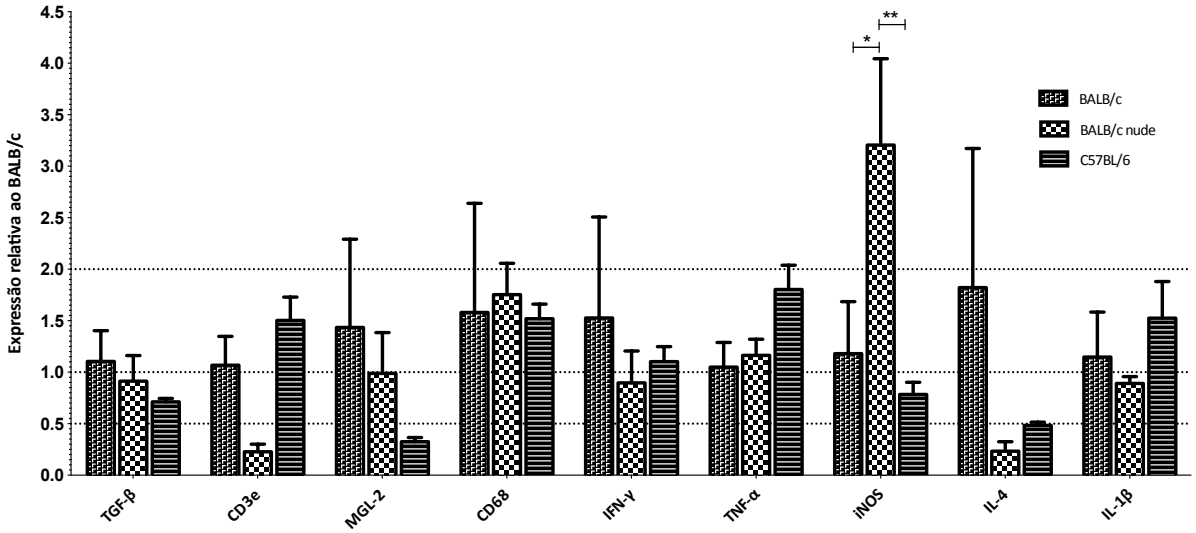

Figura 9 - Expressão relativa por Real Time RT-PCR de *TGF-β, CD3e, CD68, MGL-2, IFN-γ, TNF-α, NOS, IL-4 e IL-1β*, normalizados por *GAPDH*, em baço de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados (3 animais de cada). Análise estatística por ANOVA * $p \leq 0.05$ e ** = $p \leq 0{,}01$.

A análise de genes nas amostras revelou diferença estatisticamente significativa apenas para iNOS. Era de se esperar pouca ou nenhuma diferença para marcadores como *CD68* e *MGL-2*, os quais se relacionam com células da imunidade inata. Ao contrário do esperado, a expressão de *CD3e* em BALB/c nude também não mostrou diferença estatística em comparação com C57BL/6 e BALB/c. Tal fato pode ser atribuído ao pequeno número de amostras, além da presença de "*T like cells"* em tecidos linfóides periféricos, as quais apresentam em sua superfície receptores de linfócitos T (ROLSTAD, 2001). Observa-se ainda na figura 9 similaridade na expressão de *IFN-γ* e *IL-4* nos três animais. Uma resposta Th1 x Th2 mista em infecção por *L. amazonensis* pode justificar a semelhança estatística entre BALB/c e C57BL/6 (JI et al., 2002). Esperávamos uma expressão bastante baixa de *IL-4* em camundongos nude, devido ao pequeno número de células T produtoras dessa citocina T. Isso foi, de fato, observado, embora o grande desvio da expressão em BALB/c tenha tornado essa diferença não significativa (p=0,061).

Uma possível explicação para a expressão semelhante de *IFN-γ* e *TNF-α* em BALB/c nude seria a presença de células NK, que apresentam importante atividade citotóxica, sendo fundamentais em animais onde a concentração de células T é baixa (ROLSTAD, 2001). A baixa expressão de *CD3e* nos nude ("quase" estatisticamente significativa, com p=0,051) justifica a evolução mais lenta das lesões, tendo em vista a falta de ativação e recrutamento celular que seria desencadeada por linfócitos T. A presença e ativação de células NK (BOEHM

et al., 1997), bem como a redução em células T reguladoras, podem ser responsáveis pela maior expressão de *iNOS* em BALB/c nude. Outro dado relevante, apesar de não estatisticamente significativo, foi a baixa expressão de *IL-1β* em C57BL/6, conforme já havido sido observado nas patas infectadas (Figura 8). Isso sugere uma correlação entre esse tecido linfóide secundário e o local da infecção, pois células dendríticas e macrófagos no interior desses órgãos também podem sofrer modulação direta do parasito na síntese da *IL-1β* (XIN et al., 2007). Isso é reforçado pela já reportada infecção de células dendríticas por *Leishmania* (DE TREZ et al., 2009; VON STEBUT, 2007).

4.4 Avaliação da expressão de genes relacionados a resposta imune em linfonodo de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6

A análise da expressão dos mesmos genes em amostras de linfonodo mostrou algumas diferenças, apesar de nem todas terem sido estatisticamente significativas. Isso era de se esperar considerando que parte dos parasitos e células apresentando seus antígenos são drenados para tecidos linfóides mais próximos ao foco da infecção (AGUILAR TORRENTERA et al., 2002), nesse caso os linfonodos poplíteos. Os resultados desse experimento são mostrados na figura 10.

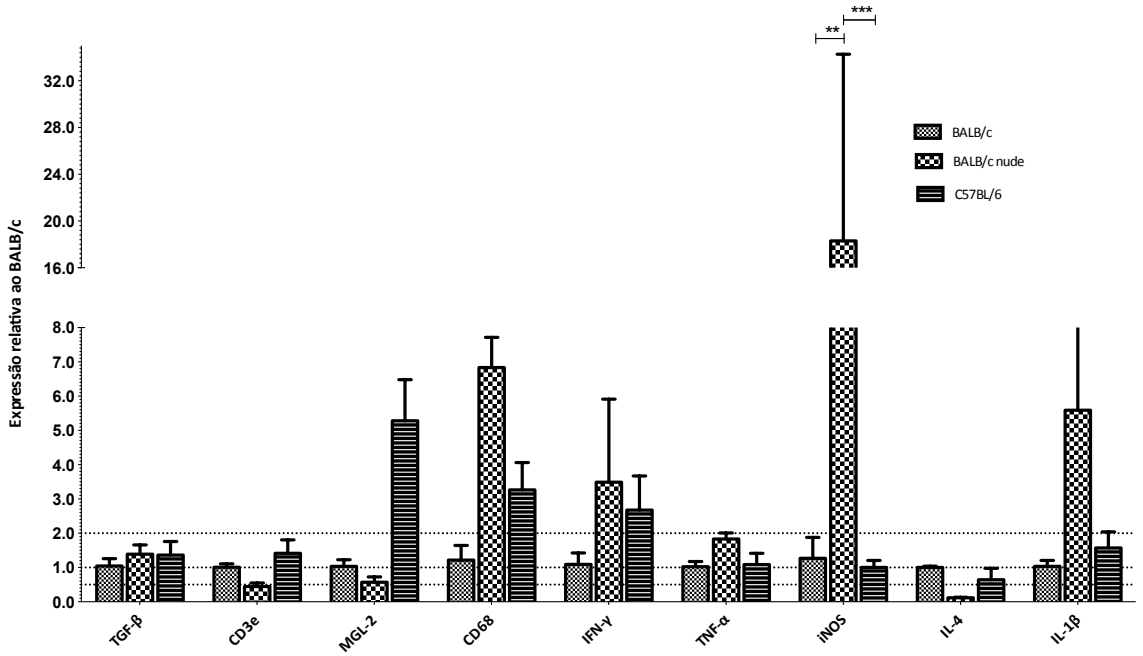

Figura 10 - Expressão relativa por Real Time RT-PCR de *TGF-β, CD3e, CD68, MGL-2, IFN-γ, TNF-α, NOS, IL-4 e IL-1β*, normalizados por *GAPDH*, em linfonodo de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6, infectados (3 animais de cada). Análise estatística por ANOVA * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; $p \leq 0,0001$.

A *MGL-2* é uma molécula presente em macrófagos e células dendríticas (RAES et al., 2005). O respectivo gene foi mais expresso (embora não significativo, com p= 0,073) nas amostras de C57BL/6, sugerindo maior recrutamento de células apresentadoras de antígeno como células dendríticas e macrófagos (*MGL-2* positivas) nesse camundongo. Por outro lado, a expressão de *CD68*, marcador de monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, mastócitos e basófilos (NG et al., 2009), foi mais acentuada em BALB/c nude e C57BL/6. Tal fato pode estar relacionado ao predomínio de células mielóides em BALB/c nude, tendo em vista a baixa quantidade de células T. No caso dos C57BL/6 o maior numero dessas células pode ser decorrente do recrutamento por células T ativadas. A migração de polimorfonucleares e células mononucleares fagocíticas para os linfonodos drenantes foi descrita como fundamental para a produção de *IL-12* e *IFN-γ* nos estágios iniciais da infecção por *L. major* (DOS SANTOS et al., 2008).

A expressão de *iNOS* foi novamente mais elevada em BALB/c nude, como já observado em baço. Esta molécula é produzida por macrófagos ativados que podem estar sendo estimulados por células NK (BOEHM et al., 1997), que representam uma população celular importante nos animais atímicos, tendo em vista a baixa quantidade de células T nesses animais. Outra molécula mais expressa em BALB/c nude (não estatisticamente significativo) foi a *IL-1β* que, conforme já descrito é produzida por monócitos, macrófagos e células dendríticas, as quais, tendo em vista o baixo numero de linfócitos T nesses animais (baixa expressão de *CD3e*), acabam exercendo importante função na tentativa de controlar a infecção. Além disso, em BALB/c nude há poucas células T regulatórias, e, com isso, pode haver um favorecimento na produção de citocinas pró-inflamatórias como *IL-1β* (MERCER et al., 2010).

4.5 Perfil celular e produção de citocinas em baço de BALB/c e BALB/c nude e C57BL/6

Com a finalidade de avaliar o perfil celular e de citocinas presentes no baço dos animais infectados por *L. amazonensis* após 13 semanas de infecção, isolamos esse órgão e analisamos populações celulares e produção de citocinas por citometria de fluxo. Esses experimentos foram realizados sob a supervisão do Professor Jean Pierre S. Peron do Departamento de Imunologia do ICB. As células foram separadas em dois grupos, que chamamos de linhagem linfóide e mielóide. Na linhagem linfóide foram avaliadas as seguintes células: linfócitos T CD4, linfócitos T CD8 e células NK, já na linhagem mielóide foram avaliados: monócitos,

macrófagos e neutrófilos, os quais foram caracterizados como sendo CD11b positivo em sua superfície.

Além dos marcadores de superfície, também foram analisadas as citocinas produzidas por cada uma delas: IFN-γ, IL-4, IL-10 e IL-12. A análise dos marcadores de superfície e de citocinas produzidas pelas células foi realizada na ausência e presença de estímulo com PMA e Ionomicina (conforme descrito em métodos). Os resultados estão mostrados na figura 11, 12, 13 e 14.

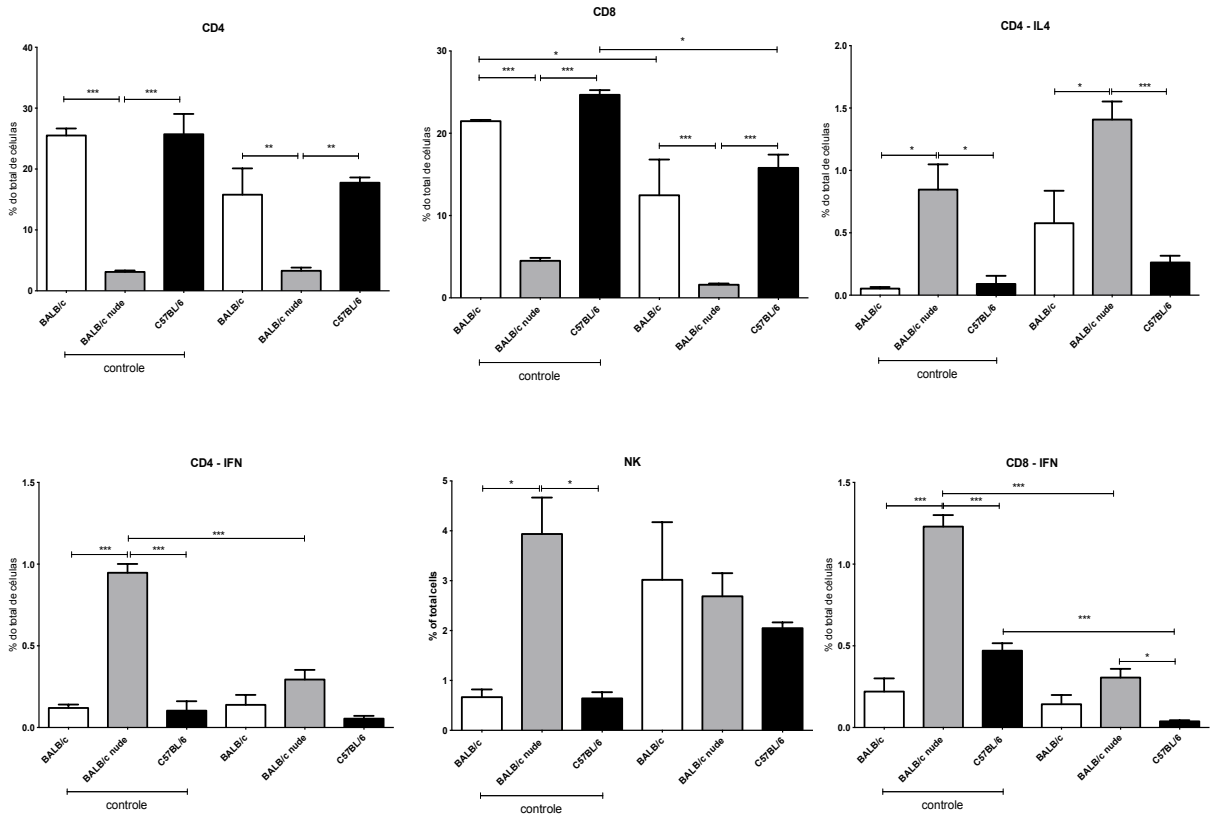

Figura 11 - Porcentagem de células linfóides e produção de citocinas em baços de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados ou não infectados (controle) com *Leishmania amazonensis* sem estímulo de PMA. Análises estatísticas por ANOVA; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ e *** = $p \leq 0,001$.

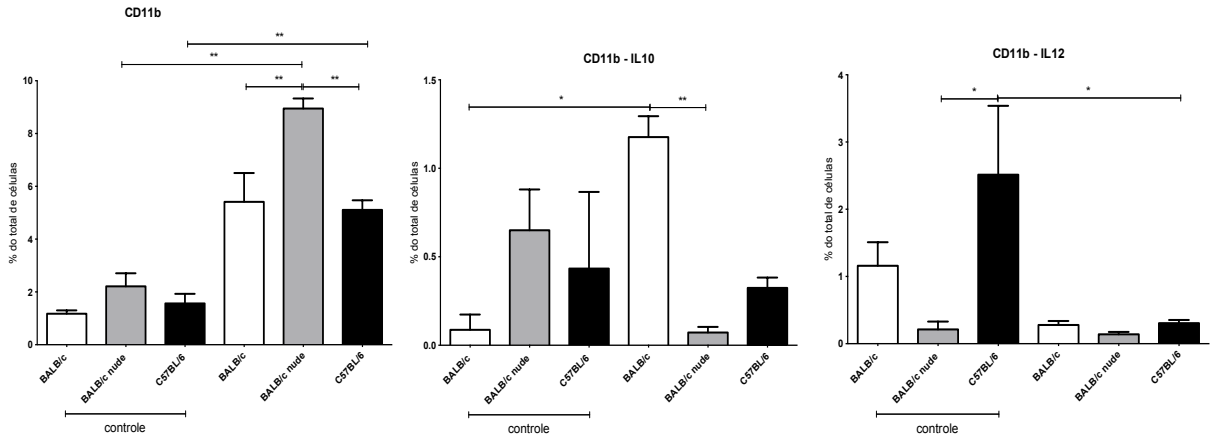

Figura 11 - Porcentagem de células mielóides e produção de citocinas em baços de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados ou não infectados (controle) com *Leishmania amazonensis* sem estímulo de PMA. Análises estatísticas por ANOVA; * = $p \leq 0{,}05$; ** = $p \leq 0{,}01$ e *** = $p \leq 0{,}001$.

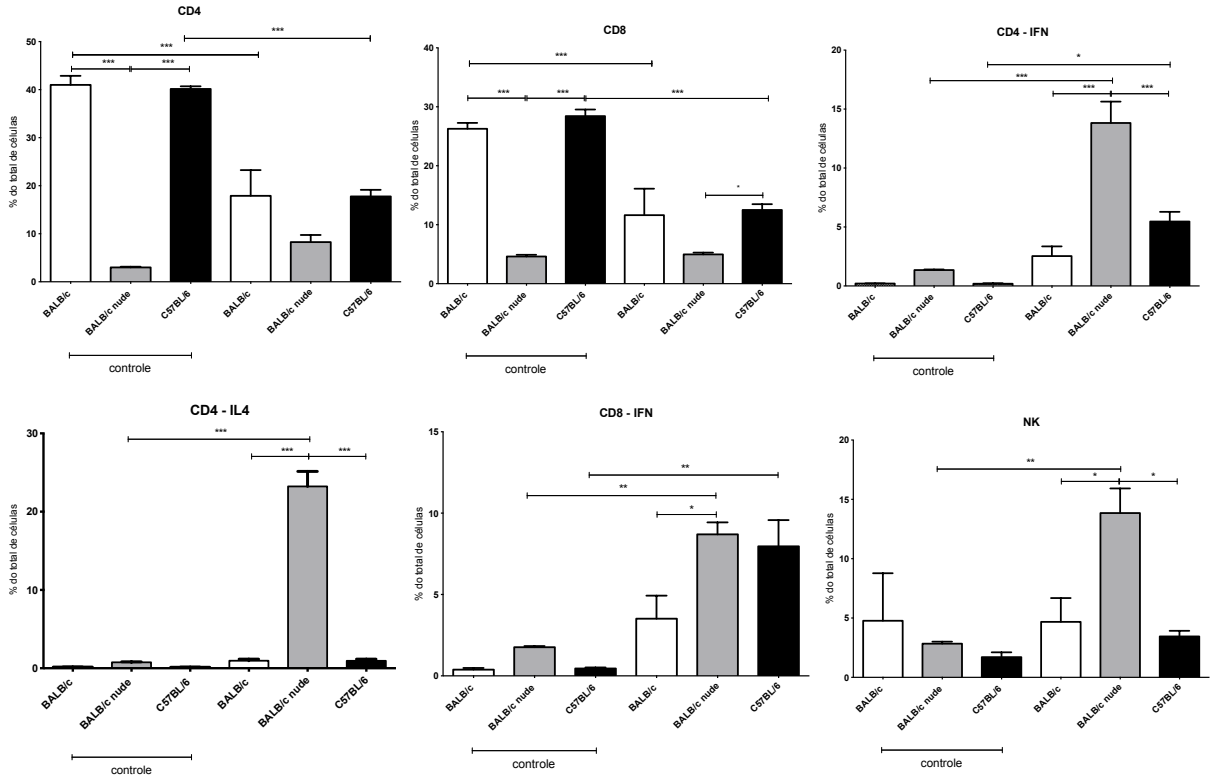

Figura 12 - Porcentagem de células linfóides e produção de citocinas em baços de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados ou não infectados (controle) com *Leishmania amazonensis* com estímulo de PMA. Análises estatísticas por ANOVA; * = $p \leq 0{,}05$; ** = $p \leq 0{,}01$ e *** = $p \leq 0{,}001$.

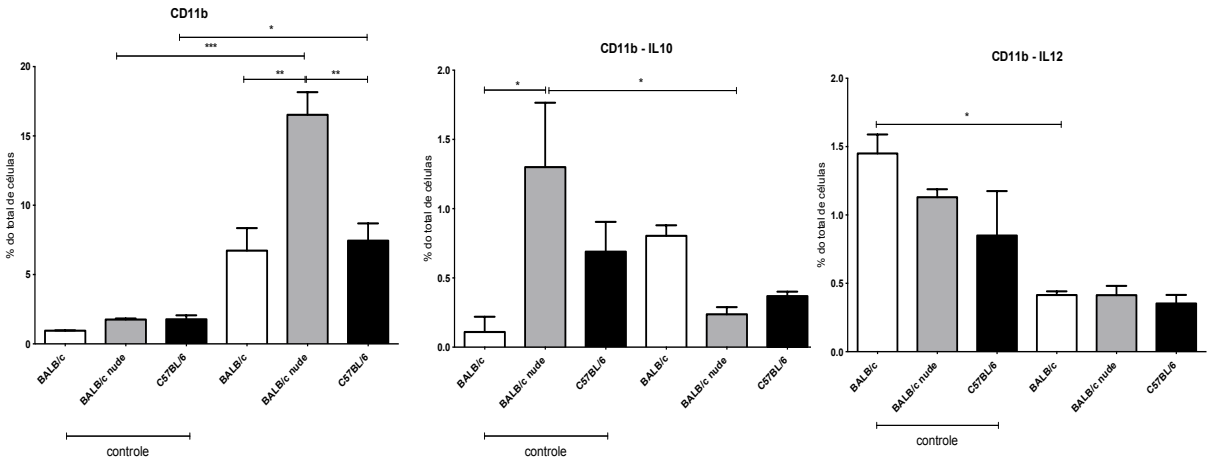

Figura 13 - Porcentagem de células mielóides e produção de citocinas em baços de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados ou não infectados (controle) com *Leishmania amazonensis* com estímulo de PMA. Análises estatísticas por ANOVA; * = $p \leq 0{,}05$; ** = $p \leq 0{,}01$ e *** = $p \leq 0{,}001$.

As figuras 11 e 12 representam as porcentagens de células na ausência de estímulo. Na figura 11 ao compararmos os grupos controle com os infectados observamos que houve diminuição estatisticamente significativa na porcentagem de células T CD8 em BALB/c e C57BL/6, diminuição da porcentagem de células T CD4 produtoras de IFN-γ em BALB/c nude, assim como diminuição de célula T CD8 produtoras de IFN-γ em BALB/c nude e C57BL/6. Podemos observar que no grupo controle há menos células T CD4 e TCD8 em BALB/c nude quando comparado com BALB/c e C57BL/6 e essa relação se manteve após a infecção. A porcentagem de células NK no grupo controle foi superior em BLAB/c nude, no entanto após a infecção ela ficou semelhante nas três linhagens. A porcentagem de células T CD4 produtoras de citocinas (IL-4 e IFN-γ) no grupo controle foi superior em BALB/c nude, o mesmo se manteve no grupo infectado para a IL-4 mas não para o IFN-γ, mostrando haver uma tendência Th2 para esses animais. Além disso fica evidente que essas células são capazes de produzir IL-4 e IFN-γ. A figura 12 (células mielóides) mostra não haver diferença entre as células/citocinas no grupo controle, exceto para a porcentagem de CD11b produtora de IL-12 que mostrou-se superior em C57BL/6 em relação ao BALB/c nude. Quando comparamos os grupos infectado e não infectados, observamos que a porcentagem de células CD11b aumentou nas três linhagens após a infecção, sendo significativa em BALB/c nude e C57BL/6. Da mesma forma a porcentagem de CD11b produtora de IL-10 em BALB/c aumentou e a porcentagem de CD11b produtora de IL-12 diminuiu em C57BL/6. No grupo controle a produção de IL-10 e IL-12 por essas células foi semelhante nos três animais, no entanto no infectado a porcentagem de CD11b produtora de IL-10 foi superior em BALB/c em comparação com o

BALB/c nude. Ressalta-se que a porcentagem de CD11b no grupo infectado foi superior em BALB/c nude.

Quando analisamos células linfóides e mielóides após o estímulo com PMA + ionomicina (figuras 13 e 14) verificamos que houve diminuição na porcentagem de células T CD4 e T CD8 em BALB/c e C57BL/6 no grupo infectado com relação ao controle. Já a porcentagem das células T CD4 produtoras de IL-4 e T CD4 produtoras de IFN-γ aumentou em BALB/c nude no grupo infectado. Com relação à porcentagem de células T CD8 produtoras de IFN-γ, houve aumentos em BALB/c nude e C57BL/6 no grupo infectado. Em BALB/c nude também observamos aumento na porcentagem de células NK no grupo infectado, o que mostra o importante papel desenvolvido por elas durante a infecção, tendo em vista da falta de células T. Ao analisarmos o perfil celular após a infecção, observamos que células T CD4 produtoras de IFN-γ e IL-4 foram mais frequentes em BALB/c nude, assim como as células NK e células T CD8 produtoras de IFN-γ, sendo essa última superior com relação ao BALB/c (figura 13).

Na linhagem mielóide (figura 14) foi observado aumento da frequência de células CD11b em BALB/c nude e C57BL/6 após a infecção, já a porcentagem de CD11b produtora de IL-10 diminuiu em BALB/c nude e a de CD11b produtora de IL-12 diminuiu em BALB/c. Após a infecção a porcentagem de células CD11b foi maior em BALB/c nude infectado do que nos demais. A porcentagem de CD11b produtora de citocinas foi semelhante entre as três linhagens após a infecção.

Como era de se esperar, em BALB/c nude foram observadas baixas porcentagens de células T CD4 e CD8. No entanto, nos chamou a atenção a maior frequência de células T CD4 produtoras de IFN-γ ou de IL-4 nesses animais, ou seja, apesar de serem atímicos suas células T são funcionais. A produção total de IL-4 no baço de nude, no entanto, deve ser menor do que nos outros animais, como indicado pela abundância do transcrito (figura 9). A maior frequência de células NK pode ser consequência da baixa frequência de células T, já que os dados são percentuais. Ainda assim, essas células são provavelmente suficientemente abundantes para justificar a maior expressão do gene de iNOS observada em baço e linfonodo de BALB/c nude, tendo em vista que essas células também produzem IFN-γ, a qual é uma citocina fundamental para induzir a produção de óxido nítrico por macrófagos (MUKBEL et al., 2007). Da mesma forma ficou claro não haver polarização da reposta imune em BALB/c e C57BL/6, já que a porcentagem de células T produtoras de IL-4 e IFN-γ foi semelhante entre eles.

4.6 Perfil celular e produção de citocinas em linfonodo de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6

Assim como foi feito com o baço, também avaliamos o perfil celular e de citocinas nos linfonodos poplíteos dos animais controle e após 13 semanas de infecção por *L. amazonensis*. Além dos marcadores de superfície, também foram analisadas as citocinas produzidas pelas células. Alguns marcadores foram avaliados em linfonodo e não em baço, devido a pouca disponibilidade dos anticorpos para realização das duas marcações. Os resultados estão apresentados na figura 15, 16, 17 e 18.

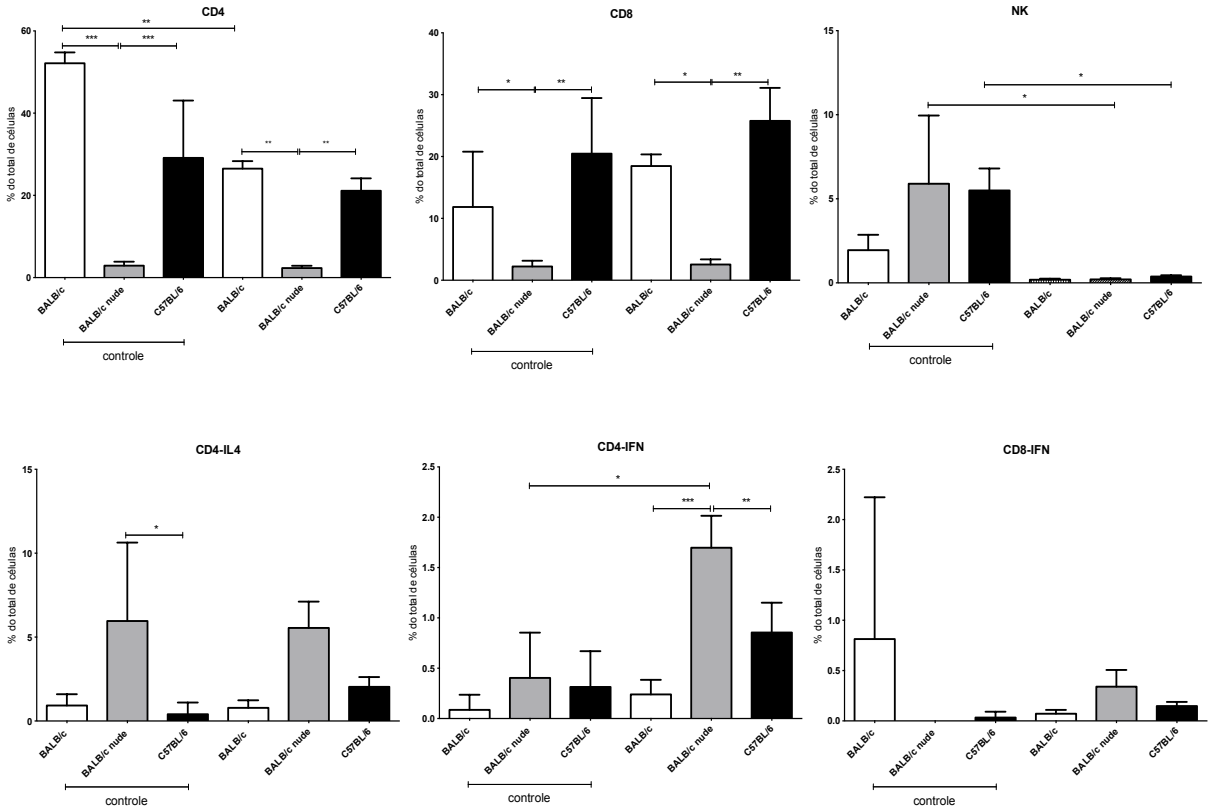

Figura 14 - Porcentagem de células linfóides em linfonodos de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados ou não infectados (controle) com *Leishmania amazonensis* sem estímulo de PMA. Análises estatísticas por ANOVA; * = $p \leq 0{,}05$; ** = $p \leq 0{,}01$ e *** = $p \leq 0{,}001$.

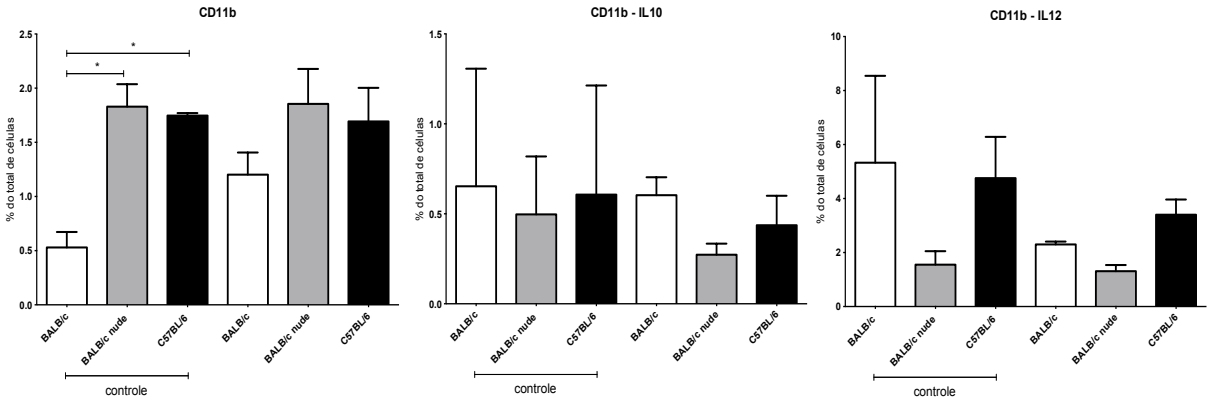

Figura 15 - Porcentagem de células mielóides em linfonodos de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados ou não infectados (controle) com *Leishmania amazonensis* sem estímulo de PMA. Análises estatísticas por ANOVA; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ e *** = $p \leq 0,001$.

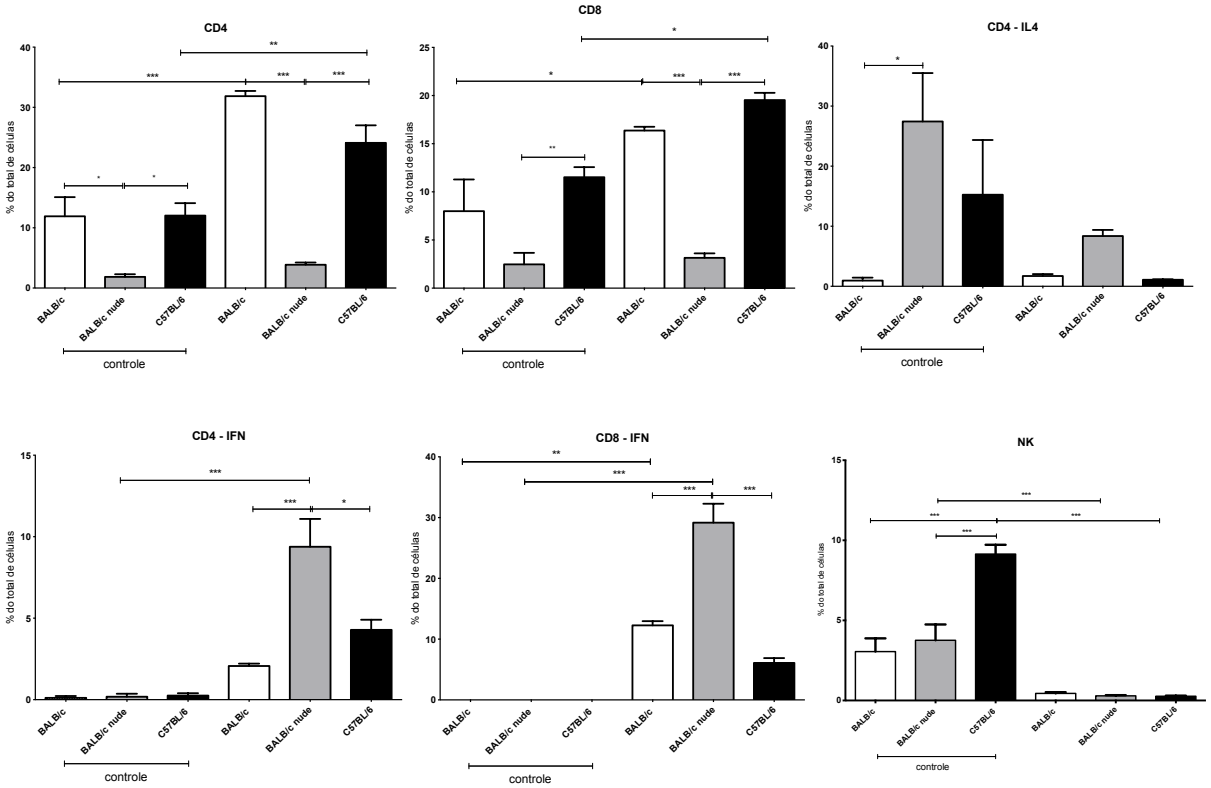

Figura 16 - Porcentagem de células linfóides em linfonodos de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados ou não infectados (controle) com *Leishmania amazonensis* com estímulo de PMA. Análises estatísticas por ANOVA; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ e *** = $p \leq 0,001$.

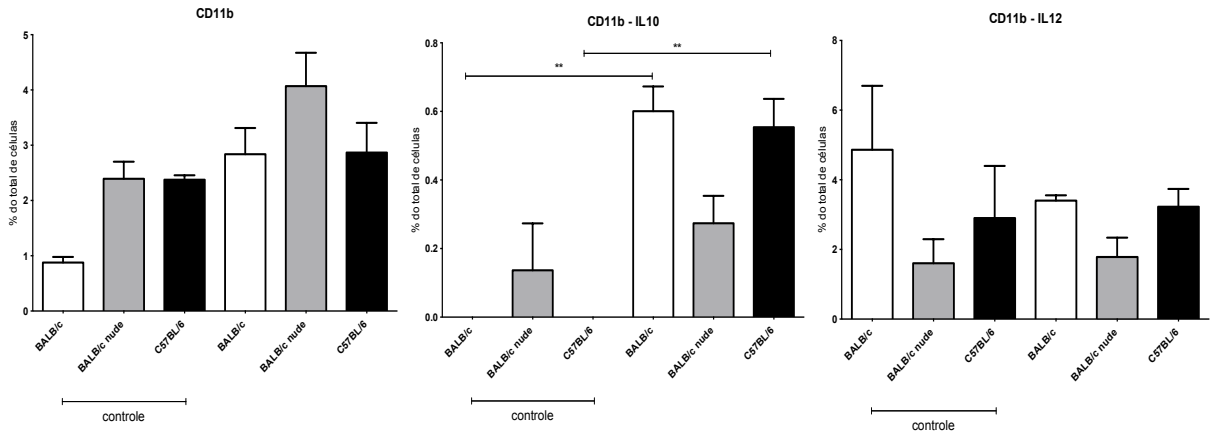

Figura 17 - Porcentagem de células mielóides em linfonodos de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 infectados ou não infectados (controle) com *Leishmania amazonensis* com estímulo de PMA. Análises estatísticas por ANOVA; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ e *** = $p \leq 0,001$.

As figuras 15 e 16 representam os resultados das células que não receberam estímulo com PMA + Ionomicina. Quando comparamos os resultados do grupo controle frente ao infectado pudemos observar que houve diminuição na porcentagem de células T CD4 em BALB/c, assim como diminuição nas células NK em BALB/c nude e C57BL/6. Já a porcentagem de células T CD4 produtoras de IFN-γ aumentou em BALB/c nude. Os resultados das células linfóides foram semelhantes aos de baço, ou seja, menores porcentagens de células T CD4 e CD8 em BALB/c nude no grupo controle e infectados, estatisticamente significativos, sendo que nos últimos essa diferença foi estatisticamente significativa (figura 15), no entanto não foi observada diminuição nas populações de células T CD4 em C57BL/6 e T CD8 em BALB/c e C57BL/6, como visto em no baço. Já havia sido relatado que essas células podem ter um aumento de até 4 vezes em animais infectados por *L. amazonensis* (WANASEN et al., 2008), e em nosso caso o aumento foi maior do que o referido por esses autores. A porcentagem de células T CD4 produtoras de IL-4 e IFN-γ mostrou-se superior em BALB/c nude, sendo a última estatisticamente significativa. Para as células mielóides (figura 16) não houve diferença entre o grupo controle e infectado para cada um dos marcadores/animais. No grupo controle a porcentagem de células CD11b foi superior em BALB/c nude e C57BL/6 que em BALB/c. No entanto essa relação não se manteve após a infecção.

Ao analisarmos o perfil de células linfóides/citocinas após o estímulo com PMA + Ionomicina verificamos que houve um aumento na porcentagem de células T CD4 e T CD8 em BALB/c e C57BL/6 no grupo infectado, diferente do observado no baço, onde houve diminuição dessas células. Já as células NK diminuíram em BALB/c nude e C57BL/6 após a in-

fecção. Com relação à porcentagem de células produtoras de citocinas, houve aumento na porcentagem de células T CD4 produtoras de IFN-γ em BALB/c nude. As células T CD8 produtoras de INF-γ aumentaram em BALB/c e BALB/c nude. Após a infecção pudemos verificar as populações de células T CD4 secretoras de IFN-γ e T CD8 secretoras de IFN-γ em BALB/c nude foi superior às de BALB/c e C57BL/6 (figura 17). Como visto nas células do baço, as poucas células T CD4 e T CD8 dos linfonodos de BALB/c nude são capazes de produzir citocinas como IFN-γ e IL-4.

Quando analisamos o perfil celular/citocinas em células da linhagem mielóide (figura 18) verificamos que houve aumento na porcentagem de células CD11b produtoras de IL-10 em BALB/c e C57BL/6 após a infecção, no entanto, não observamos diferença estatisticamente significativa entre as linhagens para cada marcador, tanto no grupo controle quanto no grupo infectado.

De forma geral esses resultados nos mostram que nos três animais a infecção induz uma resposta imune celular de padrão misto (conforme já observado no baço), com recrutamento de células importantes para a captura e apresentação de antígenos, como células dendríticas e macrófagos. Em BALB/c nude há baixa frequência de células T CD4 e T CD8, no entanto, essas células podem produzir IFN-γ e IL-4 sob estimulo inespecífico como PMA.

4.7 Expressão de CP, LACK, LRR17, metacaspase, PDI e STI, em amastigotas isolados de BALB/c e BALB/c nude

Muitos trabalhos publicados sobre *Leishmania* abordam a relação parasito/hospedeiro do ponto de vista da modulação na resposta imune do hospedeiro exercida pelo parasito (AFONSO E SCOTT, 1993; CARLSEN et al., 2013; MILLS et al., 2000; OLIVIER et al., 2005; SANABRIA et al., 2008). A fim de avaliar se o parasito sofre modulação pela resposta do hospedeiro realizamos cinco experimentos nos quais foram infectados 5 animais BALB/c e 5 animais BALB/c nude. Ao final de 13 semanas esses animais foram sacrificados e foram isolados amastigotas das patas infectadas, que foram reunidos em dois pools (um de BALB/c e um de BALB/c nude por experimento) e lisados para obtenção de extrato protéico. Para verificar a influência da resposta imune do hospedeiro sobre os amastigotas selecionamos, com base na literatura de fatores de virulência em diferentes espécies de *Leishmania*, 6 proteínas relacionadas com a sobrevivência/virulência do parasito: CP, LACK, LRR17, metacaspase, PDI e STI, cuja abundância foi avaliada em extrato protéico solúvel dos amastigotas por Wes-

tern Blotting. A expressão dessas proteínas foi analisada nos extratos de amastigotas de lesão mencionados.

Nas figuras 19 e 20 mostramos o Western Blotting e a expressão normalizada de LACK e metacaspase nas amostras de amastigotas isolados de BALB/c e BALB/c e nude.

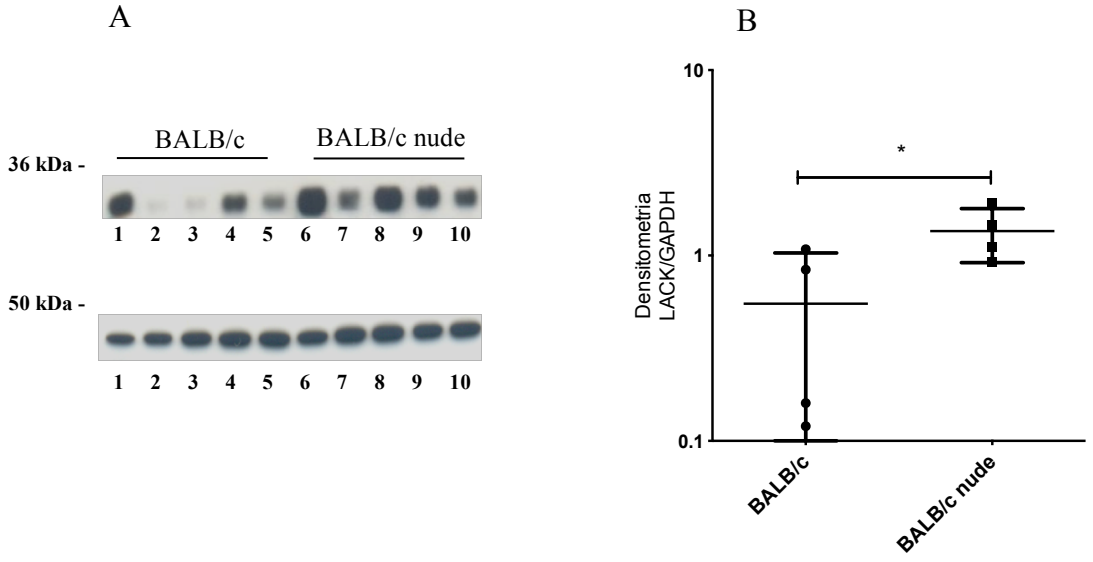

Figura 18 - Expressão de LACK (B) por Western blotting em amastigotas isoladas de lesão de BALB/c e BALB/c nude (total de 5 experimentos). (A) representa imagem de Western blotting mostrando proteína de interesse (banda superior) e GAPDH (banda inferior,) em extratos solúveis de amastigotas isolados de BALB/c (1-5) e BALB/c nude (6-10). Análises estatísticas por ANOVA; * = $p \leq 0,05$.

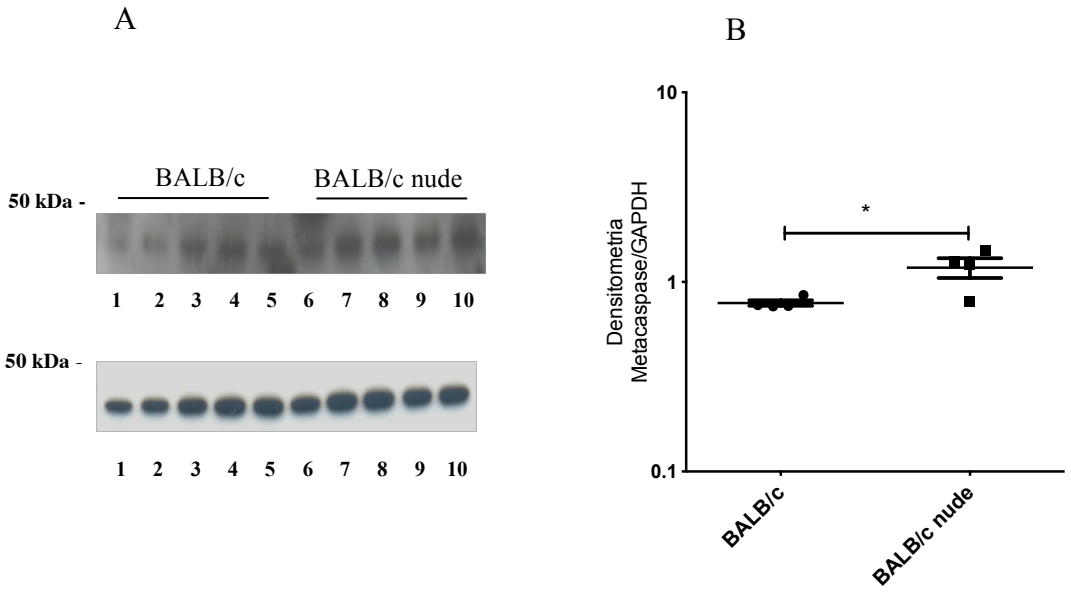

Figura 19 - Expressão metacaspase (B) por Western blotting em amastigotas isoladas de lesão de BALB/c e BALB/c nude (total de 5 experimentos). (A) representam imagem de Western blotting mostrando proteína de interesse (banda superior) e GAPDH (banda inferior,) em extratos solúveis de amastigotas isolados de BALB/c (1-5) e BALB/c nude (6-10). Análises estatísticas por ANOVA; * = $p \leq 0,05$.

Tanto a LACK quanto a metacaspase foram mais expressas em amastigotas de BALB/c nude do que nos de BALB/c (figuras 19 e 20). Esses resultados reforçam a idéia de que diversos aspectos do fenótipo do parasito podem sofrer modulação pela resposta imune do hospedeiro, conforme já havia sido demonstrado em estudos que avaliaram a exposição de fosfatidilserina (PS) em amastigotas isolados de diferentes animais (WANDERLEY et al., 2006). Nesse trabalho, formas amastigotas de BALB/c expunham mais PS que amastigotas de C57BL/6 e parasitos que expunham mais PS foram relacionados com a produção de citocinas anti-inflamatórias, com o TGF-β e IL-10. Os autores relacionaram ainda a exposição de PS com o desenvolvimento de lesões em C57BL/6, já que os maiores níveis de PS foram encontrados no pico do desenvolvimento destas. Em um trabalho mais recente foi avaliada a exposição de PS em parasitos isolados de pacientes portadores das formas cutânea localizada (LCL) e difusa (LDC) da leishmaniose (FRANCA-COSTA et al., 2012). Esse trabalho mostrou que amastigotas isolados dos pacientes com LDC expunham mais PS do que aqueles isolados de LCL (FRANCA-COSTA et al., 2012). Outro dado interessante foi a maior exposição de PS em isolados de BALB/c do que de BALB/c nude. Os animais BALB/c nude, por serem atímicos, praticamente não possuem células T, ou seja, imunologicamente tem semelhanças funcionais com pacientes que desenvolvem a LDC. Curiosamente, os resultados foram contrários a

isso. Os autores relacionam esse achado com a modulação positiva exercida por células T murinas na exposição de PS em amastigotas (FRANCA-COSTA et al., 2012).

Em relação a nossos achados, a maior expressão de LACK e metacaspase em amastigotas isolados de BALB/c nude sugere a participação de respostas T dependentes na regulação negativa da expressão dessas proteínas em BALB/c. Essa modulação pode ser resultado de citocinas secretadas diretamente por células T e/ou produzidas por células inflamatórias recrutadas para a lesão pelas células T ativadas.

A LACK é um análogo do receptor da Kinase C de mamíferos, e sua função parece estar relacionada com a indução de reposta Th2 (KELLY E LOCKSLEY, 2004; KELLY et al., 2003). Essa ativação de resposta Th2 ocorre devido ao intenso processo de multiplicação de células T CD4 que expressam elevadas concentrações de IL-4 (SCHILLING E GLAICHENHAUS, 2001; STETSON et al., 2002). Foi demonstrado que macrófagos recém infectados por promastigotas são extremamente hábeis em estimular linfócitos T reativos a este antígeno; diferentemente de infecções com amastigotas. No entanto a expressão de LACK em promastigotas e amastigotas é semelhante, o que sugere uma dificuldade da proteína expressa pelo amastigota em alcançar o MHC II (PRINA et al., 1996). A LACK tem sido considerada uma importante candidata para o desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose (DE OLIVEIRA GOMES et al., 2012; GOMES et al., 2007; SALAY et al., 2007; SANCHEZ-SAMPEDRO et al., 2012).

Pouco se sabe sobre as funções da LACK, no entanto há indícios de ela seja capaz de reconhecer e se ligar a sequências de aminoácidos presentes na DNA Polimerase e RNA Polimerase, o que faria dela uma proteína envolvida diretamente no ciclo celular (GONZALEZ-ASEGUINOLAZA et al., 1999). Embora em tripanossomatídeos haja poucos trabalhos sobre o papel da LACK, seu análogo em mamíferos, a RACK, foi relacionada com o controle de radicais livres em células humanas (KORCHAK E KILPATRICK, 2001). Dessa forma, podemos sugerir que em um ambiente onde há poucas células T reguladoras, como é o caso das lesões de BALB/c nude, pode haver maior produção de radicais livres de oxigênio, que podem ser controlados pela maior abundancia da LACK nos amastigotas isolados desses camundongos.

As metacaspases (MCAs) são formas evolutivas distantes das caspases dos metazoários e são restritas às plantas, fungos e protozoários (AMBIT et al., 2008). São enzimas do tipo cisteíno peptidases pertencentes ao clã CD, família C14 (AMBIT et al., 2008). MCAs e caspases possuem regiões com alta similaridade (ARAVIND et al., 1999), e ambas apresentam a subunidade p20 e a díade catalítica histidina/cisteína (H/C) (UREN et al., 2000). As caspases tem especificidade por substratos com ácido aspártico na posição P1, enquanto que as MCAs de

plantas (VERCAMMEN et al., 2007) e de *Leishmania* (GONZALEZ et al., 2007) tem especificidade por arginina/lisina.

A metacaspase foi descrita simultaneamente em *L. donovani* (LEE et al., 2007) e em *L. major* (GONZALEZ et al., 2007) e foi posteriormente identificada em *L. mexicana* (CASTANYS-MUNOZ et al., 2012) e *L. infantum* (KHADEMVATAN et al., 2011). A maioria das espécies de *Leishmania* possui um único gene para MCA, mas *L. infantum* e *L. donovani* possuem dois genes (revisado por GANNAVARAM et al., 2012). Em *Leishmania* a MCA parece ter funções importantes não só na morte celular induzida por diferentes estímulos, mas também no controle da divisão celular do parasita.

A superexpressão dos dois genes (*MCD1* e *MCD2*) da MCA de *L. donovani* é observada quando os parasitos são submetidos a stress oxidativo (LEE et al., 2007). A *MCD1* é mais expressa em formas amastigotas axênicas do que em promastigotas, o que justifica a maior atividade "*Tripsina like"* nessa forma evolutiva do parasito, sugerindo sua importância para a sobrevivência no interior de células do hospedeiro vertebrado (LEE et al., 2007). Em *L. major* ocorre auto processamento da MCA quando ocorre morte celular (conforme medido pela exposição de PS e perda de potencial de membrana) (GONZALEZ et al., 2007; ZALILA et al.).

Em *L. major* a MCA é expressa em ambas as formas de seu ciclo de vida, sendo encontrada em diferentes compartimentos intracelulares de acordo com a fase do ciclo celular do parasita: em vesículas citoplasmáticas na intérfase e associada ao cinetoplasto e ao núcleo durante a mitose (AMBIT et al., 2008). Seu papel está relacionado com a segregação de organelas e progressão do ciclo celular em condições normais (AMBIT et al., 2008). Recentemente foi obtida uma *L. mexicana* nula para a MCA, mostrando que ela não é fundamental para a progressão do ciclo de vida do parasito (CASTANYS-MUNOZ et al., 2012). Os dados obtidos nesse trabalho mostraram que a enzima é supressora do crescimento de amastigotas, controlando a intensidade da infecção no hospedeiro mamífero.

A relação entre metacaspase e morte celular por apoptose foi mostrada em diferentes espécies de *Leishmania* (GONZALEZ et al., 2007). O estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio foi avaliado como modulador da MCA pela análise de *Saccharomyces cerevisiae* mutante nula para MCA e posteriormente complementada com MCA de *L. major* (Lmj-MCA) (GONZALEZ et al., 2007). A levedura mutante nula apresentou maior resistência ao estresse oxidativo em comparação à selvagem. Sua sensibilidade ao tratamento foi recuperada pela complementação com a MCA de *L. major* com a consequente exposição de "PS", sendo esta recuperação dependente da atividade catalítica da MCA (GONZALEZ et al., 2007). Um es-

tudo complementar indicou que a exposição ao peróxido de hidrogênio está associada a uma maior externalização de “PS" em *L. major* que superexpressa a região catalítica da MCA (ZALILA et al.). A utilização de Miltefosina também sugere que a MCA possui um papel na morte celular programada de *L. infantum*, porque a droga induz a morte celular em promastigotas com características de apoptose, acompanhada da superexpressão de MCA (KHADEMVATAN et al., 2011). Em *L. donovani* foi mostrado que a morte induzida por DiSB (3-O,28-O-disuccinyl betulin), que gera stress oxidativo, parece estar associada com a ativação da MCA através da via mitocondrial (CHOWDHURY et al., 2014).

Como podemos observar, as funções da metacaspase parecem ser bastante diversas e até controversas dependendo do contexto. O papel da MCA como supressora do crescimento de *Leishmania* (CASTANYS-MUÑOZ et al., 2012) é contrário ao que achamos, pois observamos maior carga parasitária em BALB/c nude, o qual também apresentou amastigotas com maior expressão de metacaspase. Como as funções da MCA não foram estudadas em *L. amazonensis*, é possível que haja alguma diferença em relação ao que foi descrito para outras espécies do parasita. É possível ainda que algumas funções dessa proteína não tenham sido descritas devido às limitações dos modelos usados, que se baseiam em superexpressão ou deleção do gene da MCA e que, portanto, avaliam a função da enzima em contextos que diferem do natural da infecção.

As demais proteínas analisadas não foram diferencialmente expressas em amastigotas isoladas de BALB/c e BALB/c nude, como mostrado nas figuras 21, 22, 23 e 24.

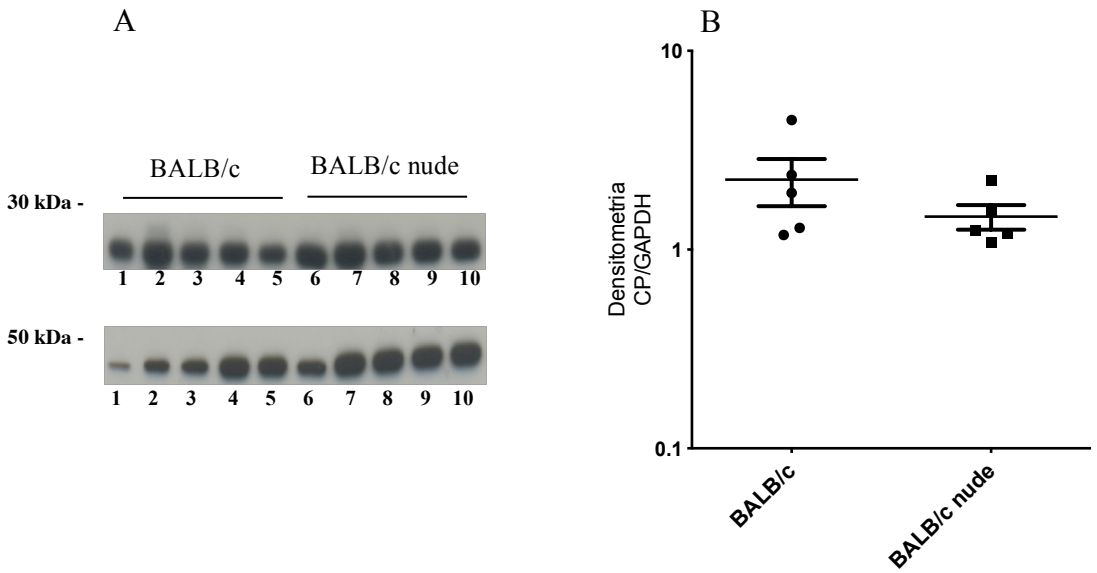

Figura 20 - Expressão de CP (B) por Western blot em amastigotas isoladas de lesão de BALB/c e BALB/c nude (total de 5 experimentos). (A) representa imagem de Western blot mostrando proteína de interesse (banda superior) e GAPDH (banda inferior) em extratos solúveis de amastigotas isolados de BALB/c (1-5) e BALB/c nude (6-10). Análises estatísticas por ANOVA; * = $p \leq 0,05$.

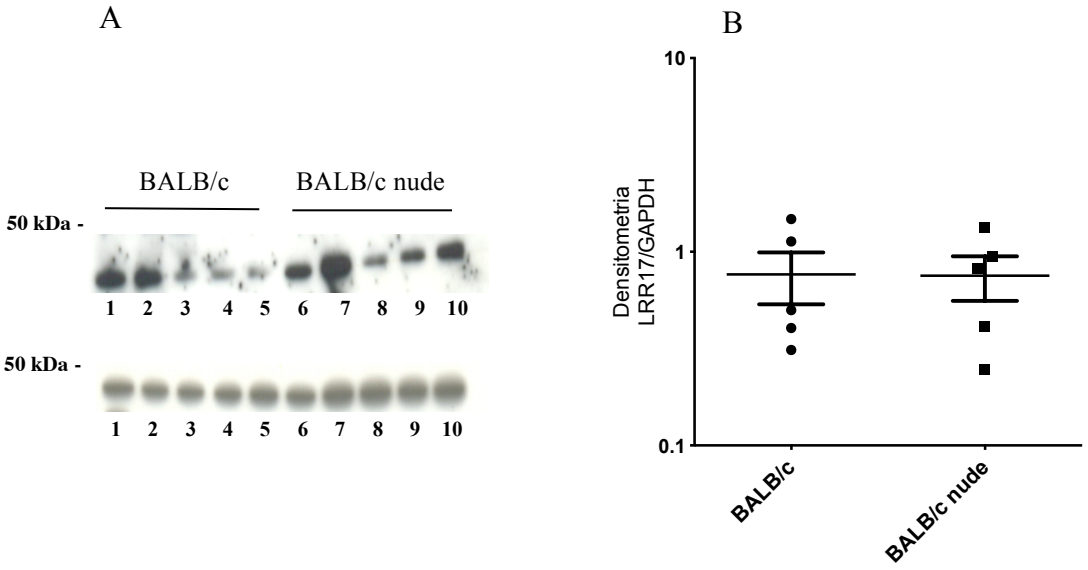

Figura 21 - Expressão de LRR17 (B) por Western blot em amastigotas isoladas de lesão de BALB/c e BALB/c nude (total de 5 experimentos). (A) representa imagem de Western blot mostrando proteína de interesse (banda superior) e GAPDH (banda inferior) em extratos solúveis de amastigotas isolados de BALB/c (1-5) e BALB/c nude (6-10). Análises estatísticas por ANOVA; * = p ≤0,05.

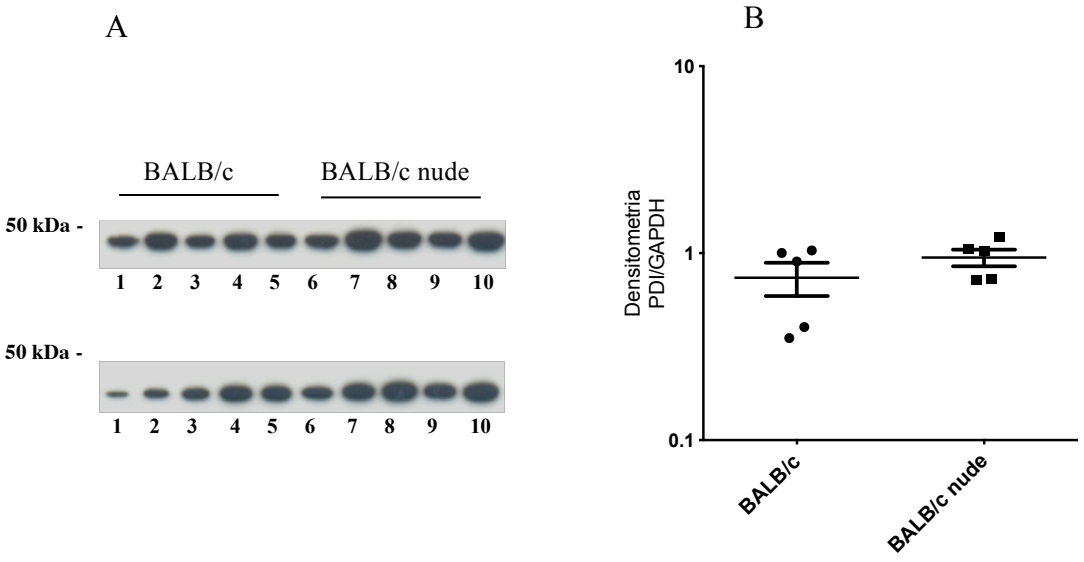

Figura 22 - Expressão de PDI (B) por Western blot em amastigotas isoladas de lesão de BALB/c e BALB/c nude (total de 5 experimentos). (A) representa imagem de Western blot mostrando proteína de interesse (banda superior) e GAPDH (banda inferior) em extratos solúveis de amastigotas isolados de BALB/c (1-5) e BALB/c nude (6-10). Análises estatísticas por ANOVA; * = p ≤0,05.

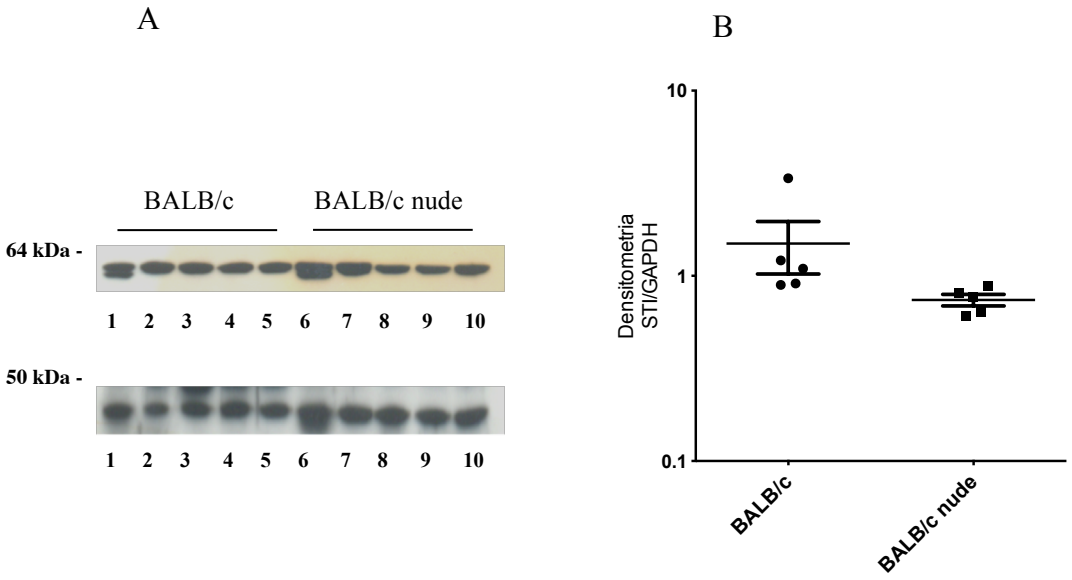

Figura 23 - Expressão de STI (B) por Western blot em amastigotas isoladas de lesão de BALB/c e BALB/c nude (total de 5 experimentos). (A) representa imagem de Western blot mostrando proteína de interesse (banda superior) e GAPDH (banda inferior) em extratos solúveis de amastigotas isolados de BALB/c (1-5) e BALB/c nude (6-10). Análises estatísticas por ANOVA; * = $p \leq 0,05$.

Esses resultados sugerem que CP, LRR17, PDI e STI não são moduladas em termos de abundância pelo sistema imune do hospedeiro murino. Ainda assim, é possível que alguma(s) dela(s) sofra(m) modificações pós-traducionais de acordo com o ambiente imunológico do hospedeiro, o que não seria detectado por Western blot convencional. De fato, nosso grupo observou alterações pós-traducionais em proteínas como triparredoxina peroxidase citoplasmática e oligopeptidase B, que resultaram em diferentes isoformas em géis 2D de amastigotas isolados de BALB/c e BALB/c nude (TEIXEIRA et al., manuscrito aceito para publicação).

Uma das proteínas que estudamos foi a CP, e recentemente foi demonstrado que seu gene é diferencialmente expresso em termos de RNA em parasitos de lesões de BALB/c e CBA ao final de 12 semanas de infecção (PEREIRA et al., 2012). Nesse mesmo trabalho os autores observaram ainda que a expressão do gene para o MHC I foi maior em CBA e a expressão do gene para o MHC II foi maior em BALB/c. Em nosso trabalho não observamos diferença na expressão de CP em amastigotas isolados de BALB/c e BALB/c nude.

4.8 Avaliação da atividade da metacaspase em amastigotas isoladas de BALB/c e BALB/c nude

Diante da observação de que a metacaspase é mais expressa em amastigotas isolados de BALB/c nude decidimos comparar a atividade dessa proteína nas duas amostras. A atividade dessa enzima é do tipo tripsina-like, já que cliva os substratos em lisina/arginina. Para tanto, realizamos uma nova infecção em 5 BALB/c e 5 BALB/c nude e após 13 semanas isolamos os e extraímos proteínas solúveis nas condições adequadas para o ensaio. Os resultados encontrados mostram que os amastigotas isolados de BALB/c nude, além de expressarem mais metacaspase (figura 20), também apresentam maior atividade tripsina-like (figura 25).

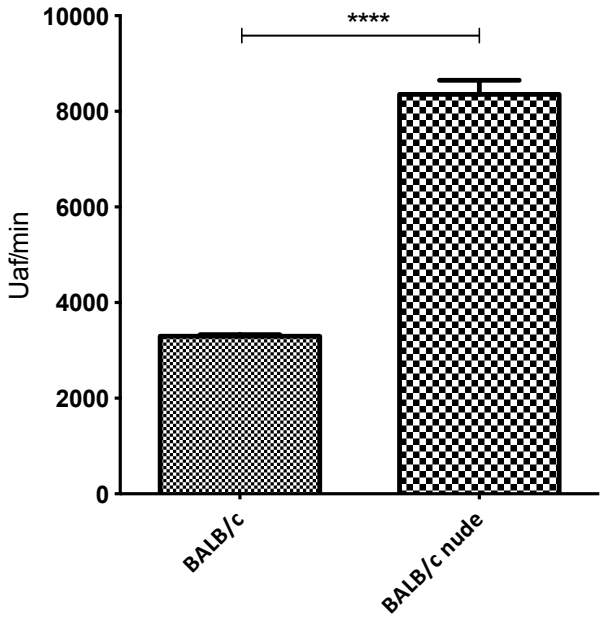

Figura 24 - Atividade tripsina-*like* em 2 µg de extrato protéico solúvel de amastigotas isoladas de BALB/c e BALB/c nude (5 animais de cada). Quantificação feita em fluorímetro utilizando 10 µM do substrato sintético para cisteíno-proteinases (Z-Arg-Arg-AMC). Resultados apresentados em unidades arbitrárias de fluorescência por minuto (uaf/min), como média e desvio de um experimento com triplicatas técnicas. Análises estatísticas por ANOVA; * = $p \leq 0{,}05$; ** = $p \leq 0{,}01$ e *** = $p \leq 0{,}001$.

Conforme já discutimos anteriormente, a menor ativação celular observada em BALB/c nude pode ter contribuído para a maior expressão da metacaspase, associada a uma maior atividade. Como o papel da metacaspase na sobrevivência e multiplicação de *Leishmania* é bastante controverso, não podemos afirmar que a expressão mais alta da enzima em amastigotas de BALB/c nude confere vantagem para sobrevivência desse parasita. Nosso gru-

po mostrou que a metacaspase é induzida em *L. amazonensis* por de stress oxidativo e por choque térmico (PEÑA, 2012 – dissertação). Essas informações sugerem que a expressão da MCA seria mais elevada em parasitas isolados de lesões com maior stress oxidativo. Não avaliamos o stress oxidativo em patas infectadas de BALB/c e nude, mas a expressão de iNOS foi mais elevada em BALB/c (Figura 8). É importante comparar marcadores de stress oxidativo nas lesões desses camundongos para tentar reproduzir essas condições em infecções *in vitro* e avaliar sua correlação com expressão da MCA em amastigotas.

4.9 Avaliação do efeito de IFN-γ e IL-4 na infecção de macrófagos

Os resultados apresentados na figura 8 mostraram maior expressão de iNOS, IFN-γ, IL-1β e IL-4 nas patas infectadas de BALB/c após 13 semanas de infecção. Elaboramos então a hipótese de que IFN-γ e IL-4 poderiam ter interferência na expressão diferencial de MCA e LACK em amastigotas de BALB/c e nude.

Para verificar isso, inicialmente avaliamos o efeito de diferentes concentrações de IFN-γ (5,9 ng/mL, 11,8 ng/mL e 23,6 ng/mL) e IL-4 (2,0 ng/mL, 5,0 ng/mL e 50 ng/mL) na infecção de macrófagos peritoneais de BALB/c. Os resultados encontrados mostraram que a maior concentração de IFN-γ (23,6 ng/mL) e todas as concentrações de IL-4 utilizadas causaram diferenças estatisticamente significativas no índice de infecção em macrófagos quando comparadas à infecção sem estímulo. Como esperado, IFN-γ causou redução e IL-4 aumento na infecção. Os resultados são mostrados na figura 26.

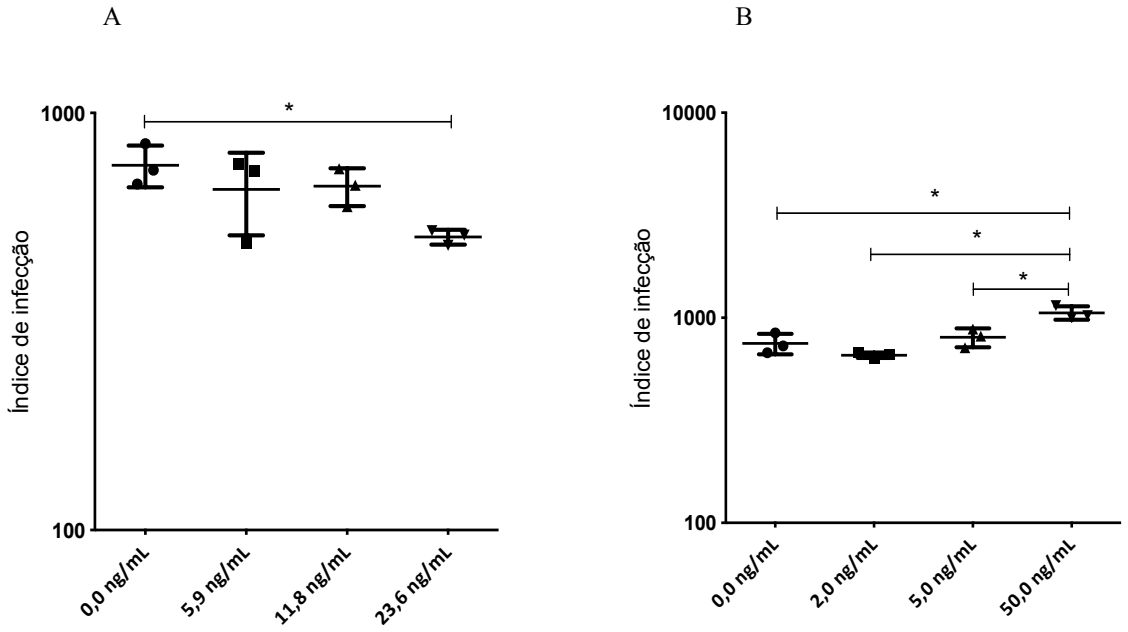

Figura 25 - Índice de infecção de macrófagos peritoneais de BALB/c sob estímulo de IFN-γ (A) e IL-4 (B). Experimento realizado em triplicata para cada uma das condições. Análises estatísticas por ANOVA; * = p≤ 0,05.

Diferente do que ocorre na infecção por *L. major,* foi descrito que a suscetibilidade da infecção por *L. amazonensis* depende mais de falhas na ativação da resposta Th1, do que da ativação da resposta Th2 (AFONSO E SCOTT, 1993). O estímulo com IFN-γ em cultura de macrófagos já havia sido realizado em infecção com *L. amazonensis* e *L. major* e observou-se que a adição dessa citocina controla de forma mais efetiva a infecção com *L. major* do que com *L. amazonensis* (AFONSO E SCOTT, 1993). Nesse trabalho, somente a adição de IFN-γ (100 UI/mL) não foi suficiente para diminuir o índice de infecção em macrófagos por *L. amazonensis.* Em nosso trabalho a concentração que apresentou redução no índice de infecção em macrófagos foi de aproximadamente 200 UI/mL.

4.10 Expressão de LACK e metacaspase em amastigotas isolados de macrófagos infectados na presença de IFN-γ e IL-4

Para avaliar o efeito de IFN-γ e IL-4 na expressão de LACK e metacaspase escolhemos as concentrações de citocinas que mais alteraram o índice de infecção. Realizamos um experimento no qual utilizamos macrófagos medulares e os infectamos com formas promastigotas de *L. amazonensis.* Após 3 dias isolamos os amastigotas e os utilizamos para infectar

novos macrófagos medulares, agora com IFN-γ (23,6 ng/mL), IL-4 (50 ng/mL), IFN-γ (23,6 ng/mL) + IL-4 (50 ng/mL) e sem estímulo. Após 72 horas isolamos os amastigotas e extraímos proteínas solúveis a fim de analisar a expressão da LACK e da metacaspase. Os resultados são apresentados nas figuras 27 e 28.

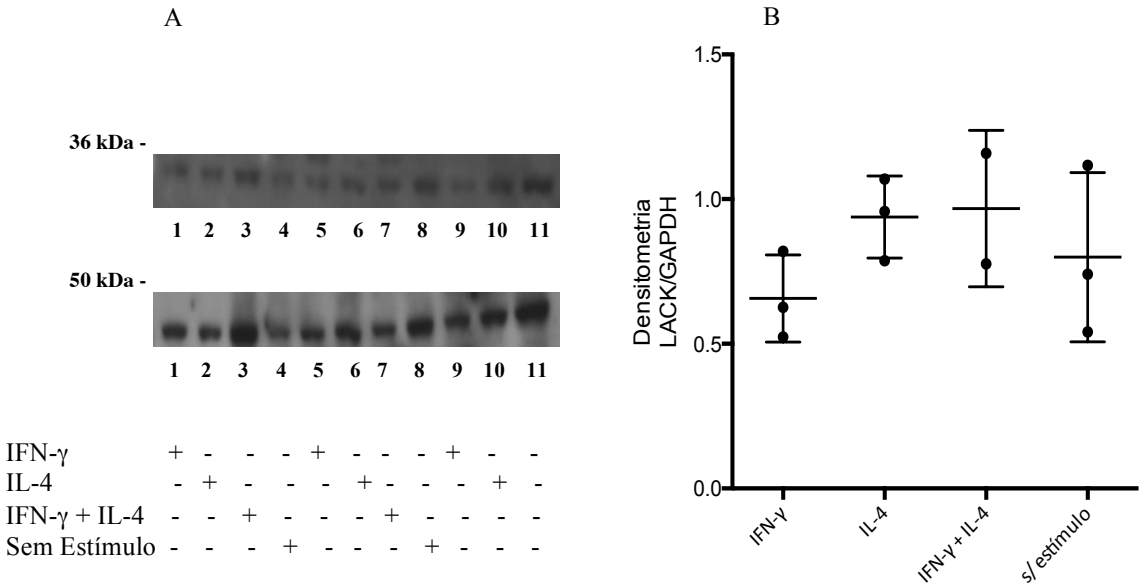

Figura 26 - Expressão de LACK (B) por Western blot em amastigotas isolados de macrófagos sob diferentes estímulos em 3 experimentos. As concentrações de IFN-γ e IL-4 foram 23,6 ng/mL e 50ng/mL, respectivamente:. Imagem do Western blot (A) mostrando proteína de interesse (banda superior) e GAPDH (banda inferior) em extratos solúveis de amastigotas isoladas de macrófagos sob estímulo de IFN-γ (1, 5, 9); IL-4 (2, 6, 10); IFN-γ + IL-4 (3, 7); Sem estímulo (4, 8, 11). Análises estatísticas por ANOVA; * = $p \leq 0,05$.

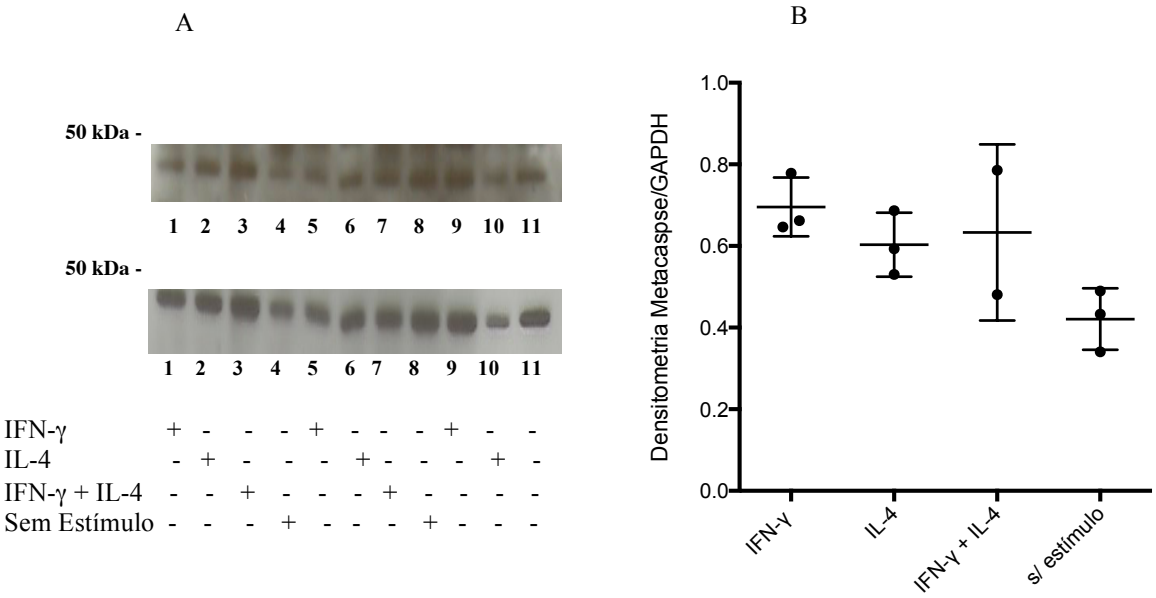

Figura 27 - Expressão de metacaspase (B) por Western blot em amastigotas isolados de macrófagos sob diferentes estímulos em 3 experimentos. As concentrações de IFN-γ e IL-4 foram 23,6 ng/mL e 50ng/mL, respectivamente: Imagem do Western blot (A) mostrando proteína de interesse (banda superior) e GAPDH (banda inferior) em extratos solúveis de amastigotas isoladas de macrófagos sob estímulo de IFN-γ (1, 5, 9); IL-4 (2, 6, 10); IFN-γ + IL-4 (3, 7); Sem estímulo (4, 8, 11). Análises estatísticas por ANOVA; * = p ≤0,05.

Como mostrado nas figuras 27 e 28, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão em nenhuma das proteínas na presença de IFN-γ e/ou IL-4, o que nos faz pensar que IFN-γ e IL-4 não são capazes de modular a síntese dessas proteínas nas concentrações testadas, ou que não são capazes de modular essas proteínas sozinhos, sendo necessários outros fatores.

Com os dados apresentados neste trabalho podemos afirmar que o padrão/intensidade a infecção por *L. amazonensis* está diretamente relacionada com o estado imunológico do hospedeiro (no caso, diferentes linhagens murinas) e que a resposta imune dele é capaz de modular a expressão de proteínas no parasito. No entanto, há a necessidade de se buscar explicações para os mecanismos envolvidos nesse processo. Como perspectivas, nosso grupo irá avaliar futuramente a expressão da LACK e da metacaspase em amastigotas isolados de pacientes com as formas cutânea localizada e difusa da leishmaniose. Esta avaliação trará mais respostas sobre a fisiopatologia dessa doença e permitirá que novos projetos possam ser executados com o propósito de melhor entender a relação parasito/hospedeiro na infecção por *L. amazonensis.*

4.11 Avaliação histopatológica das patas dos animais infectados

Tendo em vista que não foi possível caracterizar o perfil celular e de citocinas por citometria de fluxo nas patas infectadas em virtude da lise celular causada pelo procedimento dos experimentos, principalmente em macrófagos de BALB/c nude, realizamos a histopatologia desse tecido, na qual foram avaliados os seguintes parâmetros: porcentagem de linfócitos, monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos, além de alterações teciduais causadas pela infecção. A leitura das lâminas foi feita pela Dra. Eloisa Resende, do departamento de parasitologia da USP.

Os resultados da figura 29 mostram que nas patas de BALB/c houve maior infiltrado celular (linfócitos e células mielóides). Esses dados corroboram com os observados na FACs (baço e linfonodo) e justificam a maior expressão de genes relacionados a resposta imune descritos no Real-Time PCR. Além disso, chama-se a atenção para a quantidade relativa de células dos C57BL/6 infectados, as quais não apresentaram aumento em relação ao grupo controle (exceto macrófagos). O não aumento pode ser justificado pelo controle da infecção no momento do sacrifício.

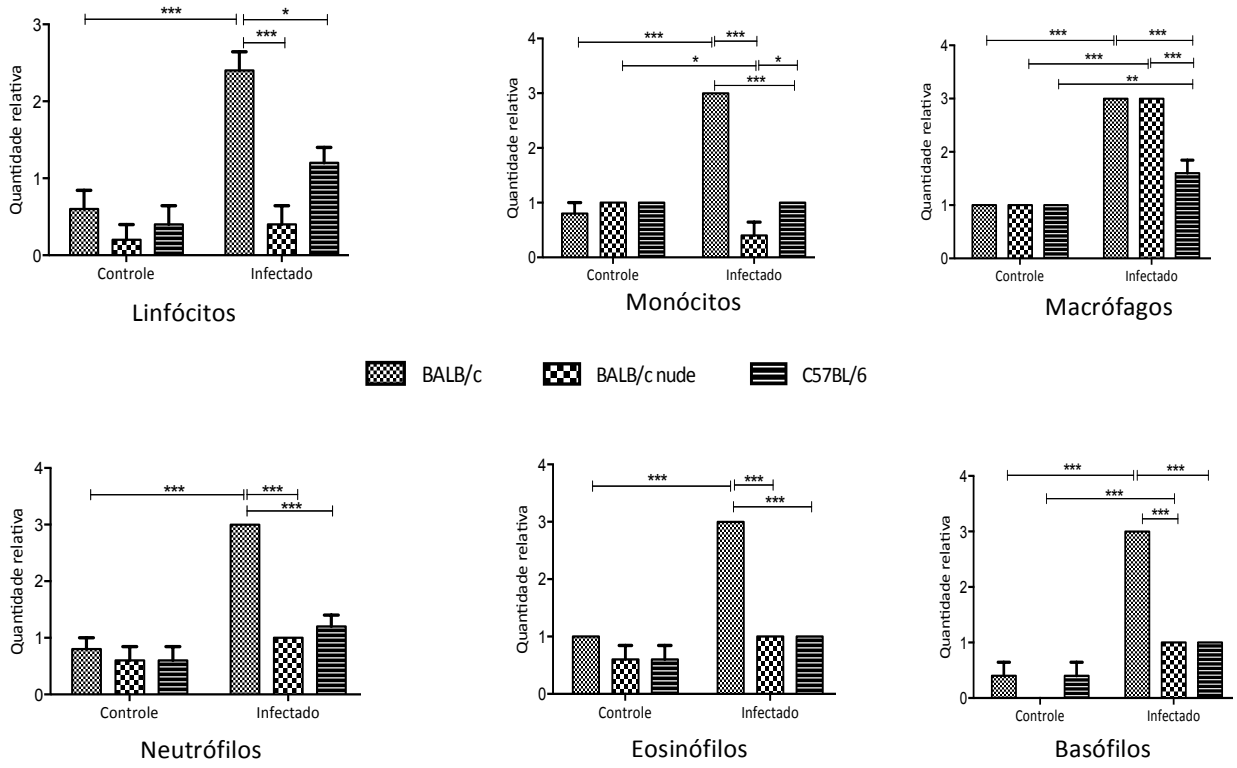

Figura 28 – Análise histopatológica – perfil celular - em BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 (5 animais de cada) 13 semanas após a infecção com *Leishmania amazonensis* LV79. Análises estatísticas por ANOVA. * = $p \leq 0,05$; ** =$p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

A figura 30 mostra as alterações teciduais e parasitismo nas patas das três linhagens de animais infectadas após 13 semanas de infecção.

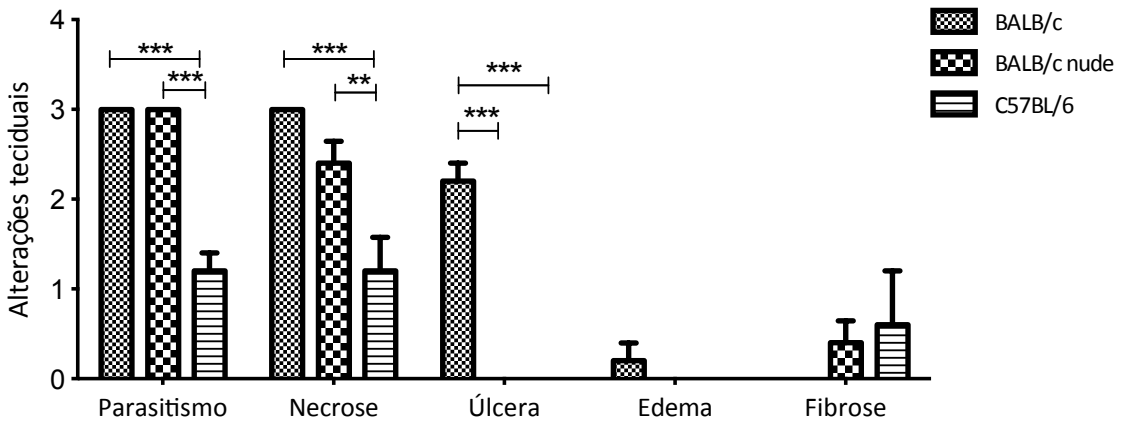

Figura 29 - Análise histopatológica – alterações teciduais - em BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 (5 animais de cada) 13 semanas após a infecção com *Leishmania amazonensis* LV79. Análises estatísticas por ANOVA. * = $p \leq 0,05$; ** =$p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

Observa-se nos resultados acima que o parasitismo nas patas de BALB/c e BALB/c nude foi superior ao encontrado em C57BL/6 (corroborando o achado na diluição limitante). Tal fato já era previsto, tendo em vista do controle da infecção neste animal. A necrose mostrou-se maior em BALB/c em relação as outras duas linhagens. Isso já era de se esperar, já que a resposta inflamatória, conforme já discutido nos resultados de Real-Time, foi superior nesses animais.

BALB/c também mostrou mais ulceração nas patas que os demais animais. Realmente essa observação já havia sido feita no momento do sacrifício, em que as patas desses animais apresentavam extensas úlceras no local da infecção com presença de uma crosta recobrindo-a, diferente do observado em BALB/c nude que, apesar das patas estarem bastante inchadas não apresentavam úlceras. Este fato deve estar relacionado ao intenso infiltrado celular presente nas patas de BALB/c em relação aos demais, que foi responsável pelo maior dano tecidual.

Os resultados mostram haver uma relação direta entre o parasitismo e a necrose tecidual, já que tiveram padrão semelhante, por outro lado a ulceração parece não estar relacionado ao parasitismo. De fato isso foi observado em nas patas de BALB/c nude, as quais mesmo não apresentado ulcerações com as de BALB/c, eram as que continham maior carga parasitá-

ria. Dessa forma podemos relacionar a ulceração com a resposta inflamatória no local, a qual foi mais pronunciada nas amostras de BALB/c.

A análise histopatológica nos permite ter uma visão direta do tecido e a situação em que ele se encontrava no final da infecção, sendo possível traçar um número relativo de células do sistema imune presentes, além disso foi possível relacionar os tipos celulares encontrados com a carga parasitária presente no mesmo.

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 reposta 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-1β,* 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 loca 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 numero 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*. Concluímos 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://bvsms.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. **Biosecur 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-harbouring 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.

HUGENTOBLER, 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.

JI, 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.

KHADEMVATAN, 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. Recrudescent 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, tryparedoxin

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-1beta 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.