

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Avaliação do Efeito do Lipofosfoglicano  
(LPG) de *Leishmania amazonensis* e de  
*Leishmania braziliensis* na infecção por  
*Leishmania***

Roberta Passamani Ambrosio

OURO PRETO, JUNHO DE 2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - NUPEB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Avaliação do Efeito do Lipofosfoglicano (LPG)  
de *Leishmania amazonensis* e de *Leishmania  
braziliensis* na infecção por *Leishmania***

**Autora: Roberta Passamani Ambrosio  
Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

**OURO PRETO, JUNHO DE 2008**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Imunoparasitologia do Núcleo de pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, sob orientação do Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso, com auxílio financeiro Pronex FAPEMIG/CNPq, CNPq e Universidade Federal de Ouro Preto.

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha mãe, Dalva Passamani, que mesmo longe sempre esteve presente no meu coração e pensamento, e ao meu amor, Claudinei, que em todos os momentos esteve ao meu lado apoiando todas as minhas decisões e me dando todo amor que necessitava para continuar lutando pelos meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Luís Carlos Crocco Afonso, orientador e amigo, por me ensinar a difícil tarefa da busca incessante pelo conhecimento científico. Obrigada por me ensinar que sou capaz.

Ao professor Dr. Rodrigo Soares pelo apoio e por me incentivar no caminho que escolhi.

À professora Dr. Beatriz Stransk que me ensinou a dar os primeiros passos na vida científica.

Aos companheiros e amigos do LIP, com vocês aprendi a sorrir, ser companheira, ensinar e aprender. Obrigada por tornarem as horas de trabalho mais alegres e mais gostosas de serem vividas.

As minhas ex-alunas de iniciação científica, Paula e Lays, pela disposição e vontade de ajudar.

Ao Marcorélio e Leandro pela amizade e por contribuírem na preparação dos materiais, sem o trabalho de vocês tudo seria mais difícil.

À Cida pela alegria e incondicional disposição em ajudar.

Aos professores do NUPEB por estarem sempre dispostos a contribuir e por manterem as portas dos laboratórios sempre abertas.

Aos amigos do NUPEB, por colaborarem com reagentes, com dicas ou com um simples sorriso no corredor.

À PRONEX-FAPEMIG/CNPq e UFOP, pelo apoio financeiro ao trabalho.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A Deus, pela vida, tropeços e vitórias que fizeram de mim alguém melhor com vontade de continuar a acertar e a errar sempre.

À minha mãe pela dedicação e apoio incondicional em todas as decisões da minha vida, e ao meu pai que de onde estiver sempre estará olhando por mim.

Ao Claudinei pelo amor e dedicação, pelos momentos de alegrias e de tristezas que nos tornaram cúmplices. Sem você realmente não teria chegado até aqui. TE AMO.

Às amigas Andi e Jane, pelo apoio, amizade e oportunidade de conviver com pessoas maravilhosas que fazem a vida valer a pena.

Aos amigos do LIP, Eduardo, Tiago e Amanda, que com palavras ou gestos fizeram-se presentes nos momentos importantes da minha vida. Obrigada pelo apoio científico e fraterno.

Aos amigos do mestrado Joamy e Fabiana que mesmo durante a correria do mestrado demonstraram amizade e carinho.

E a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para minha formação como profissional, pesquisadora e ser humano. OBRIGADA.

---

---

**RESUMO**

Na busca por novos medicamentos e formas de tratamento da Leishmaniose estudos têm sido direcionados à compreensão dos mecanismos de interação parasito/hospedeiro.

A resposta inicial desencadeada pelo parasito parece ser crucial no direcionamento da infecção e no processo de cura ou resistência. A molécula de LPG, presente na superfície das formas promastigotas de protozoários do gênero *Leishmania*, por possuir grande variabilidade estrutural interespecífica tem se tornado objeto de estudo a fim de se elucidar mecanismos iniciais desta importante interação. Neste trabalho foram verificadas grandes diferenças na proporção da molécula de LPG de *L. braziliensis* e de *L. amazonensis* evidenciando a diversidade estrutural e/ou quantitativa deste glicolípide de superfície.

Verificamos que a administração LPG de *L. braziliensis* e o LPG de *L. amazonensis*, em excesso, durante infecções por *L. braziliensis*, no modelo murino não foram capazes de alterar o perfil de lesão provocado pelo protozoário. No entanto células do baço e linfonodo de camundongos infectados com *L. braziliensis* na presença de LPG foram capazes de produzir a citocina IL-10, relacionada aos mecanismos de regulação da resposta imune celular.

Além disto, LPGs purificados não foram capazes de ativar macrófagos intraperitoneais, porém, quando adicionados em conjunto com LPS e IFN- $\gamma$  foram capazes de alterar o perfil de ativação quanto a produção de NO ou IL-10. O LPG de *L. braziliensis* tem efeito direto em macrófagos ativado diminuindo a produção de NO de maneira dose dependente, demonstrando efeito direto deste LPG na eliminação do protozoário pela célula hospedeira. No entanto, o LPG de *L. amazonensis* não induz tal efeito, porém, é capaz de diminuir a produção de IL-10. Receptores do Tipo Toll 2 (TLR2) parecem não estar envolvidos nestes processos. Apesar destas alterações provocadas pelos LPGs estudados tais moléculas não foram capazes de modificar a expressão, em macrófagos, de moléculas envolvidas na ativação, apresentação e migração celular.

Nossos dados demonstram que a presença do LPG é capaz de induzir diferentes mecanismos da resposta imune durante a ativação de macrófagos, tal fato pode ocorrer devido à variabilidade da molécula entre as espécies de *Leishmania*.

Este trabalho vem contribuir para elucidação de mecanismos complexos que envolvem a diversidade da resposta imune do hospedeiro e conseqüentemente a cura ou resistência a infecções por parasitos do gênero *Leishmania*.



**ABSTRACT**

The search for new drugs for the treatment of Leishmaniasis has focused in the understanding of the mechanisms in host-parasite interaction. This disease manifests itself in a wide array of manifestations due to both parasite- and host-related peculiarities.

The early immune response caused by the parasite can be crucial in the development of infection and in the healing and/or resistance process. The Lipophosphoglycan (LPG) molecule, present in large amounts in the surface of promastigotes forms, has shown great structural variability amongst the several species that belong to the *Leishmania* genus. Therefore, understanding the initial mechanisms of the interaction of LPG in the host-parasite relationship is an important step towards understanding the differences between the several presentations of this disease. In this work differences were verified in the proportion of the molecule of LPG in *L. braziliensis* and *L. amazonensis* evidencing the diversity structural and/or quantitative of this surface glycoconjugate.

Despite the variability between LPGs, their inoculation in association with *L. braziliensis* in infections in mice were not capable to alter the lesion development provoked by the protozoan. However spleen and lymph node cells of mice infected with *L. braziliensis* and LPG were capable to produce the cytokine IL-10 which has an important role in the regulation of the immune response.

Besides, purified LPGs were not capable to activate intraperitoneal macrophages. However, when added together with LPS and IFN- $\gamma$ , LPGs were capable to alter the production of NO or IL-10. LPG from *L. braziliensis* has a dose-dependent effect in activated macrophages reducing the production of NO. On the other hand, LPG from *L. amazonensis* decreased the production of IL-10 by activated macrophages. In spite of these effects, the studied LPGs were not capable to modify the expression of molecules involved in the activation, presentation and cellular migration of macrophages. TLR2 does not seem to be required for observed effects.

Our work contributes for the elucidation of the complex mechanisms that involve the immune response of the host and consequently the cure or resistance in *Leishmania* infections.

---



---

**ÍNDICE**

DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
AGRADECIMENTOS ESPECIAIS	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XIV
1-INTRODUÇÃO	17
1.1-LEISHMANIOSES	17
1.2-CICLO BIOLÓGICO	18
1.3-FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE	19
1.4-RELAÇÕES COM AS CÉLULAS DO HOSPEDEIRO VERTEBRADO E RESPOSTA IMUNOLÓGICA	20
1.5-ESTRUTURA DOS GLICOLIPÍDEOS	22
1.6-ESTRUTURA QUÍMICA E BIOSÍNTESE DO LPG	24
1.7-O PAPEL DO LIPOFOSFOGLICANO (LPG) NA INTERAÇÃO COM HOSPEDEIRO INVERTEBRADO	25
1.8-A IMPORTÂNCIA DOS GLICOCONJUGADOS NA INTERAÇÃO COM HOSPEDEIRO VERTEBRADO	26
2-OBJETIVOS	30
2.1-OBJETIVO GERAL	30
2.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3-MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1-CEPAS DE LEISHMANIA UTILIZADAS E OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS	32
3.2-EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LIPOFOSFOGLICANOS (LPG) DE LEISHMANIA	32
3.3-ANIMAIS EXPERIMENTAIS	34
3.4-EXPERIMENTOS “ <i>IN VITRO</i> ”	35
3.5-EXPERIMENTOS “ <i>IN VIVO</i> ”	36
3.6-DOSAGEM DE CITOCINAS	38
3.7-DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO	39

---

---

3.8-EXTRAÇÃO DE RNA E REALIZAÇÃO DE RT-PCR DE MACRÓFAGOS INTRAPERITONEAIS	40
3.9-CITOMETRIA DE FLUXO	41
ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5- CONCLUSÕES	73
6- BIBLIOGRAFIA	75

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1** - Identificação por Dotblotting das amostras contendo LPG extraído de *L. amazonensis* e de *L. braziliensis*.

**TABELA I** – Dosagens médias dos extratos de LPG obtidos para cada espécie de *Leishmania*.

**FIGURA 2** – Curvas de lesão desenvolvidas por camundongos C57BL/6 infectados com *L. braziliensis* com ou sem LPG.

**FIGURA 3** – Dosagem de IFN- $\gamma$  e IL-10 em sobrenadantes de cultura de células provenientes de camundongos C57BL/6 após 8 semanas de infecção com *L. braziliensis* com ou sem LPG.

**FIGURA 4** – Presença de mRNA em macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6 na ausência ou presença de LPG.

**FIGURA 5** – Efeito do LPG sobre a produção de NO e IL-10 em macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6 ativados.

**FIGURA 6** – Gráficos gerados a partir da marcação de macrófagos intraperitoneais de C57BL/6 com CD11b, CD86 e MHC II estimulados ou não na presença de LPG.

**FIGURA 7** – Gráficos gerados a partir a partir da marcação de macrófagos intraperitoneais de C57BL/6 com CD11b e CCR5 estimulados ou não na presença de LPG.

**FIGURA 8** – Efeito do LPG sobre a expressão de MHCII, CD86 e CCR5 em macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6 ativados.

**FIGURA 9** – Gráficos gerados a partir a partir da marcação de macrófagos intraperitoneais de C57BL/6 com CD11b, CD86 e MHC II estimulados ou não na presença de LPG.

**FIGURA 10** – Efeito do LPG sobre a intensidade de expressão de MHC II em macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6 ativados.

**FIGURA 11** – Efeito do LPG sobre a produção de NO e IL-10 em macrófagos intraperitoneais de camundongos TLR2-/- ativados.

**FIGURA 12** – Gráficos gerados a partir de macrófagos intraperitoneais de TLR2<sup>-/-</sup> marcados com CD11b, CD86 e MHC II estimulados ou não na presença de LPG.

**FIGURA 13** – Gráficos gerados a partir de macrófagos intraperitoneais de TLR2<sup>-/-</sup> marcados com CD11b e CCR5 estimulados ou não na presença de LPG.

**FIGURA 14** – Efeito do LPG sobre a expressão de MHCII, CD86 e CCR5 em macrófagos intraperitoneais ativados de camundongos TLR2<sup>-/-</sup> .

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ABTS – 2,2'-diazó-di (3-etil benzotiazolina sulfonato)
- APC – Aloficocaina (marcador de fluorescência)
- BSA – Albumina Sérica Bovina
- CCL – Quimiocina
- CCR 5 – Receptor de Quimiocina da família C-C
- CD ( 86, 11b...) – Moléculas de Superfície Celular
- CHCl<sub>3</sub> – Clorofórmio
- CTLA-4 – Proteína Associada a Linfócitos T Citotóxicos
- DAB – Diaminobenzidina
- DMEM – Meio Essencial Mínimo Dulbecco
- ELISA – Ensaio Imunoenzimático (enzyme linked immunosorbent assays)
- FITC – Fluoresceína (marcador de fluorescência)
- Gal – Galactose
- GIPLs – Glicosilinositolfosfolípede
- Glc – Glicose
- GPI – Fosfatidilinositol
- HAc – Ácido Acético
- HCl – Ácido Clorídrico
- HPRT – Gene constitutivo presente em camundongos
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Água Oxigenada
- IFN- $\gamma$  – Interferon-gama
- IgG – Imunoglobulina G
- IL(12,10...) – Interleucina (12,10...)
- iNOs – Óxido nítrico sintetase indutível
- LPG – Lipofosfoglicano
- LPS – Lipopolissacarídeo
- Man – Manose
- MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio
- MHC (I ou II) – Complexo de Histocompatibilidade Principal ( do tipo I ou II)
- MIP – quimiocina

mRNA – Ácido desoxiribonucleico mensageiro  
MyD88 – Molécula Adaptadora  
MTT – brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2]-2.5-difeniltetrazólio  
NF- $\kappa$ B – Fator Nuclear  $\kappa$ B  
NH<sub>4</sub>OH – Hidróxido de Amônio  
NO – Óxido Nítrico  
NK – Células *Natural Killer*  
PBS – Salina Tamponada com fosfato  
PCR – Reação da Polimerase em Cadeia  
PE – r-ficoeritrina (marcador de fluorescência)  
PGs – Fosfoglicanos  
PI – Fosfato Inorgânico  
PO<sub>4</sub> – Grupo fosfato  
PPGs – Proteofosfoglicanos  
PSPs ou gp63 – Proteases de superfície de Promastigotas  
PVDF – Fluoreto de Polivinilideno  
rm(IFN, IL-10...) – recombinante murino(IFN, IL-10...)  
RNA – Ácido desoxiribonucleico  
ROS – Radicais de Oxigênio  
RT-PCR – Transcrição reversa - Reação da Polimerase em Cadeia  
SDS – Lauril Sulfato de Sódio  
SFB – Soro Fetal Bovino  
TCD4<sup>+</sup> – Linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup>  
TCR – Receptor de Células T  
TGF- $\beta$  – Fator de Transformação de Crescimento-beta  
Th1 – T ‘helper’ 1  
Th2 – T ‘helper’ 2  
TNF – Fator de Necrose Tumoral  
TRL – Receptor Toll- like  
TRL 2-/- – Linhagem de camundongo nocaute de Receptor Toll - like do tipo 2

## ***1. Introdução***



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Leishmaniose

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por várias espécies de protozoários unicelulares digenéticos que podem ser encontrados nas formas flageladas promastigotas ou paramastigotas em um hospedeiro invertebrado, e como amastigota, em um hospedeiro vertebrado. Tais parasitos são pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* possuindo cerca de 20 espécies que infectam mamíferos e são descritas e subdivididas de acordo com o desenvolvimento no hospedeiro invertebrado (World Health Organization, 2004).

O subgênero *Leishmania* compreende espécies encontradas no Novo e Velho Mundo e que se desenvolvem no intestino anterior e médio do inseto vetor. As espécies que tem desenvolvimento adicional no intestino posterior são classificadas no subgênero *Viannia* e podem ser encontradas apenas no Novo Mundo (Cupolillo e cols., 2000; Lainson & Shaw, 1978).

Segundo dados emitidos pela Organização Mundial de Saúde, a doença está presente em 88 países de 5 continentes (Ásia, África, Europa, América do Norte e América do Sul), sendo 72 deles em desenvolvimento e 16 desenvolvidos, possui uma ampla distribuição por todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (World Health Organization, 2004).

Acredita-se que existam hoje, em todo o mundo, 12 milhões de pessoas infectadas com as diversas formas da doença e cerca de 350 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção. Estima-se que entre 1,5 - 2,0 milhões de pessoas são infectadas por diferentes espécies do parasito todos os anos (World Health Organization, 2004).

Dos casos notificados de Leishmaniose Cutânea 90% ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria 90% dos casos registrados de Leishmaniose Mucocutânea ocorrem no Brasil, Peru e Bolívia. A mesma porcentagem de casos de Leishmaniose Visceral ocorre em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (World Health Organization, 2004).

Portanto, tal patologia é considerada de grande impacto econômico e social, sendo necessárias medidas de controle ao inseto vetor e animais reservatórios, e principalmente medidas de prevenção eficazes contra a infecção.

## **1.2. Ciclo Biológico**

O ciclo de vida heteroxeno desenvolvido pelo parasito acomete hospedeiros vertebrados e invertebrados. Dentre os vertebrados, destacam-se por serem reservatórios do meio silvestre, marsupiais (gambá) e xenarthra (tatu, tamanduá e preguiça) e o cão por ser reservatório do ciclo periurbano. Uma vez inserido no ciclo silvestre ou no ciclo periurbano do parasito, o homem pode adquirir a infecção pela picada de fêmeas de insetos hematófagos pertencentes à subfamília Phlebotominae, tendo como principal representante no Velho Mundo o gênero *Phlebotomus* e no Novo Mundo o gênero *Lutzomyia* (Ashford, 2000). Tais insetos possuem uma ampla distribuição por todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais.

No ciclo de vida o parasito alterna entre formas distintas de desenvolvimento. As formas promastigotas metacíclicas são transmitidas a hospedeiros vertebrados durante repasto sanguíneo e podem infectar fagócitos do sistema mononuclear. O parasito vive em vacúolos parasitóforos (fagossomas) desta célula, onde encontram condições favoráveis para sua proliferação (Schaible e cols., 1999). O aumento de temperatura e a diminuição do pH no fagossoma de macrófagos proporcionam os sinais para a diferenciação de promastigotas para uma forma ovóide ou esférica imóvel (sem flagelo livre) com cinetoplasto em forma de bastão, denominada amastigota (Zilberstein & Shapira, 1994). A multiplicação destas formas no interior de macrófagos induz o seu rompimento liberando parasitos e levando à infecção de novas células. Macrófagos infectados com amastigotas são ingeridos por insetos durante o repasto sanguíneo.

No intestino médio do flebótomo as formas amastigotas são liberadas com o rompimento dos macrófagos ingeridos, sofrem divisão e se diferenciam em promastigotas procíclicas que colonizam o intestino médio e anterior do inseto. Logo após, as formas promastigotas se diferenciam em uma forma móvel, oval ou alongada que se adere pelo

flagelo ao epitélio do esôfago e da faringe do vetor através de hemidesmossomas (Ilg, 2001).

Tais formas se transformam em promastigotas metacíclicas que colonizam de forma intensa o intestino anterior do inseto, provocando assim, o bloqueio da válvula proventricular fazendo que os parasitos sejam regurgitados juntamente com a saliva durante atividade hematofágica do flebotomíneo (Ilg, 2001). Desta forma um novo ciclo se inicia com a picada do inseto vetor contaminado em um hospedeiro vertebrado.

### 1.3. Formas clínicas da leishmaniose

As leishmanioses humanas são caracterizadas por diversas manifestações clínicas e sintomas variando de lesões únicas na pele a infecções fatais de órgãos internos. Tais manifestações podem ser divididas em dois grandes grupos: Leishmaniose Visceral caracterizada principalmente pela infecção de órgãos como baço e fígado; e a Leishmaniose Tegumentar (Leishmaniose Tegumentar Americana, no Novo Mundo e Leishmaniose Tegumentar do Velho Mundo) caracterizada por lesões na pele e mucosas.

A forma Visceral ou Calazar é a mais grave, apresentado sintomas comuns de outras infecções, como: febre, anemia e hepatoesplenomegalia (Ashford, 2000) e geralmente estão envolvidas com infecções causadas pelas espécies *L. infantum* e *L. donovani* no Velho Mundo e *L. infantum* no Novo Mundo. No entanto, *L. amazonensis* já foi isolada de pacientes com sintomas de Leishmaniose visceral (Barral e cols., 1991).

A Leishmaniose Tegumentar cutânea é a forma mais comum da doença, tendo desenvolvimento benigno em indivíduos imunocompetentes. Manifesta-se como uma úlcera única causada pela resposta inflamatória do hospedeiro a infecção. No Brasil as espécies que comumente estão relacionadas com a Leishmaniose cutânea são: *L. braziliensis* e *L. guyanensis*; em outros países da América *L. mexicana*, *L. panamensis* e *L. peruviana* e no Velho Mundo *L. major*, *L. aethiopica* e *L. tropica* (Oumeish, 1999).

Manifestações clínicas caracterizadas pela presença de várias lesões ulceradas próximas a uma lesão principal são designadas como forma cutânea disseminada que é a forma mais rara da leishmaniose. As principais espécies causadoras desta síndrome clínica são a *L. guyanensis* e *L. braziliensis* (Wortmann e cols., 2000).

Já a forma mucosa, está associada no Novo Mundo à *L. braziliensis*, *L. panamensis*. Esta forma da doença geralmente está relacionada a uma intensa resposta do hospedeiro causando a destruição do tecido mucoso e submucoso das cavidades nasal e oral (Grimaldi, Jr. & Tesh, 1993).

Na leishmaniose difusa encontramos um quadro caracterizado por lesões difundidas por todo corpo em forma de nódulos não ulcerados devido a metátases. A *L. amazonensis* é a principal causadora desta forma clínica nas Américas, porém, *L. pifanoi* (*L. mexicana*) também pode ser encontrada. No Velho Mundo a *L. aethiopica* é a espécie envolvida na síndrome (Convit e cols., 1972).

Manifestações clínicas da doença, bem como sua patologia, são dependentes não só da espécie de *Leishmania* envolvida como também, do estado nutricional do hospedeiro e da resposta imune por ele desenvolvida (Anstead e cols., 2001). Estudos imunológicos com o modelo experimental murino para infecção por parasitos do gênero *Leishmania* têm sido utilizados para definir vários aspectos da relação parasito-hospedeiro (Milon e cols., 1995), uma vez que a resposta imune pode ser vista como um fator seletivo na evolução desta interação.

#### **1.4. Relações com as células do hospedeiro Vertebrado e Resposta Imunológica**

Quando o flebótomo infectado realiza suas atividades hematofágicas em um hospedeiro vertebrado e junto com sua saliva regurgita formas infectantes do parasito, se inicia um processo de interação das células do hospedeiro com o protozoário. Assim, moléculas derivadas do parasito e/ou do vetor, bem como as interações moleculares das mesmas, desempenham papel fundamental no decorrer da infecção. Sabe-se que tais interações são dependentes da espécie do phlebótomo e da espécie de *Leishmania* envolvidas.

Substâncias vasodilatadoras e com efeitos imunomodulatórios estão presentes na saliva do inseto vetor, como por exemplo, o Maxadilan, peptídeo da saliva de *Lutzomia longipalpis* que pode promover o estabelecimento da infecção (Castro-Sousa e cols., 2001; Rogers & Titus, 2003).

As formas promastigotas utilizam mecanismos do próprio sistema imune, como por exemplo, proteínas do Sistema do Complemento, para facilitar a entrada do parasito no vacúolo parasitóforo de monócitos e de fagócitos mononucleares, ambiente propício para multiplicação e desenvolvimento da *Leishmania*. Este mecanismo de infecção de células promovida por opsonização ocorre sem que haja ativação da explosão oxidativa da célula hospedeira (Handman & Bullen, 2002).

Grande parte da superfície celular de protozoários está coberta por estruturas glicolipídicas que interagem diretamente com células do hospedeiro. O glicoconjugado de *Leishmania* mais estudado é o Lipofosfoglicano (LPG) que parece possuir funções não só de estabelecimento do parasito no hospedeiro vertebrado, como também na sobrevivência no inseto vetor e na transmissão do protozoário.

As interações parasito/hospedeiro são determinantes para uma maior ou menor susceptibilidade à infecção. Portanto, a espécie de *Leishmania* envolvida e a predisposição do hospedeiro à infecção são cruciais na manifestação e desenvolvimento da doença.

Camundongos geneticamente susceptíveis e resistentes são utilizados para a elucidação dos mecanismos imunes relacionados à proteção (resistência) e susceptibilidade à infecção por parasitos do gênero *Leishmania*.

Parasitos da família Tripanossomatidae, em geral, são capazes de escapar da primeira barreira montada pelo Sistema Imune do hospedeiro, a Imunidade Inata. Estudos com o modelo murino mostram que a resposta imune celular mediada por linfócitos T é o principal mecanismo de resistência e controle de infecções causadas por *Leishmania major*. Uma resposta imune mediada por linfócitos T auxiliares (TCD4+) é capaz de desempenhar um importante papel na eliminação do parasito (Scott e cols., 1989).

Linfócitos T CD4+ (Th) podem se diferenciar em dois grupos de células efetoras: Th1 e Th2. Os mecanismos de diferenciação são dependentes do estímulo presente nos primeiros estágios da ativação dessas células. Na presença de citocinas como Interleucina-4 (IL-4) desenvolvem-se preferencialmente células do tipo Th2, enquanto que a presença de Interleucina-12 (IL-12), que por sua vez induz secreção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) por células *natural killer* (NK) e linfócitos T (auxiliar e citotóxico), favorece a diferenciação e proliferação de células do tipo Th1 (Scott e cols., 1989; Reiner e cols., 1994; Reiner & Locksley, 1995; Mosmann & Coffman, 1989).

Já foi demonstrado que o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th 1 com produção de IFN- $\gamma$  está relacionada com a resistência à infecção causada por *Leishmania*. Citocinas inflamatórias, como o IFN $\gamma$ , são responsáveis pela ativação de macrófagos que passam a produzir intermediários de oxigênio e nitrogênio capazes de promover a eliminação do parasito (Rogers e cols., 2002). Assim, através de ativação das células da Imunidade Inata por citocinas produzidas por linfócitos TCD4+ uma resposta eficaz contra o parasito é montada e a célula hospedeira se torna capaz de eliminar o patógeno. Além disto, uma resposta do Tipo I pode gerar células de memória que são capazes de conferir proteção prolongada ao hospedeiro em infecções por *L.major* (Stobie e cols., 2000).

Por outro lado, citocinas tais como IL-4 e TGF- $\beta$  (Fator de transformação de crescimento-beta), presentes em um tipo de resposta Th2, podem regular negativamente a ativação de macrófagos e restringir a morte do parasito (Barral-Netto e cols., 1992; Kane & Mosser, 2001).

Embora uma resposta imune contra o patógeno seja crucial para cura da infecção, a exacerbação desta resposta pode ser extremamente prejudicial ao hospedeiro, aumentando lesões teciduais. A presença de citocinas reguladoras, como IL-10 e TGF- $\beta$ , produzidas por células T reguladoras CD4+CD25+, células denominadas Th3, podem reduzir o dano provocado pelo excesso de resposta, porém, permitem a persistência do parasito no local da infecção (Ji e cols., 2005; Barral-Netto e cols., 1992; Kane & Mosser, 2001).

Portanto, a elucidação dos mecanismos imunológicos e de mecanismos desenvolvidos a partir da interação parasito-hospedeiro são fundamentais para o desenvolvimento de terapias que eliminem a doença causando menos danos ao hospedeiro.

### **1.5. O Estudo dos Glicolípídeos**

Moléculas glicolípídicas de superfície são abundantemente encontradas em protozoários. Os glicofosfatidilinositol podem ser encontrados em sua forma livre, denominada glicoinositolfosfolípides (GIPLs) ou servindo de âncoras (âncoras GPI) para proteínas ou polímeros de carboidratos. Estima-se que um protozoário expresse aproximadamente 1-10 milhões de âncoras GPI e GIPLs por célula (Mensa-Wilmot e cols., 1999). A função primária destas âncoras é a de ligar moléculas de superfície celular à

membrana destes parasitos. Porém, diversos estudos têm apontado estruturas de superfície do parasito como fatores determinantes no curso da infecção.

Vários tipos de glicoconjugados podem ser observados não só em *Leishmania* como também em outros Tripanossomatídeos. As moléculas ancoradas ao glicofosfatidilinositol (GPI) existentes na superfície de protozoários têm sido extensivamente estudadas, desempenhando um importante papel na interação com o hospedeiro vertebrado (Guha-Niyogi e cols., 2001). Embora tenham uma grande diversidade estrutural, compartilham uma estrutura central comum ligada à âncora lipídica (Ferguson, 1997).

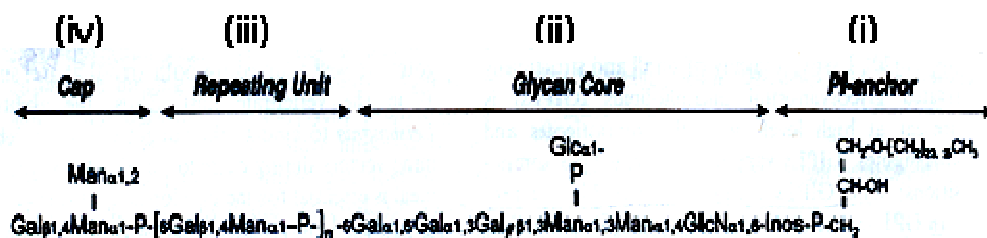
Em *Leishmania* vários glicoconjugados foram descritos. Dentre eles, estão as proteases de superfície de promastigotas (PSPs ou gp63) pertencentes a uma família de glicofosfolípides (GIPLs). Outra classe de glicoconjugado de *Leishmania* é a das fosfatases ácidas secretadas. Todas as espécies de *Leishmania*, com exceção de *L. major*, produzem sAP (Lovelace e cols., 1986; Lovelace & Gottlieb, 1986). A mais nova família de glicoconjugados estudada é a dos proteofosfoglicanos (PPGs) que estão presentes em formas amastigotas (Schneider e cols., 1993).

Dentre os glicoconjugados presentes na superfície de espécies do gênero *Leishmania* destaca-se o lipofosfoglicano (LPG), um heteropolímero formado principalmente por unidades repetitivas de  $\text{Gal}\beta 1,4\text{Man}\alpha 1-4\text{-PO}_4^-$  ancorados via GPI. O LPG parece ter papel primordial na ligação das formas promastigotas de *Leishmania* no intestino do flebótomo e sua diferenciação para as formas infectantes. É importante notar que a estrutura da LPG muda durante a diferenciação do parasito de promastigota procíclico em metacíclico (Sacks e cols., 1995; Soares e cols., 2005). Desta forma, assume-se que o LPG tenha um papel crucial no ciclo biológico e transmissão das diferentes espécies de *Leishmania*.

Devemos levar em consideração que pouco se sabe sobre o papel do LPG de espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, a maior parte dos estudos de glicobiologia são realizados em *L. major* e *L. donovani* e a variabilidade estrutural destas moléculas pode revelar diferenças fundamentais para o direcionamento da patologia desenvolvida por cada espécie.

## 1.6. Estrutura química e biossíntese do LPG

O LPG de *Leishmania* possui estrutura composta por quatro domínios principais:



- uma âncora lipídica de 1-*O*-alquil-2-*liso*-fosfatidilinositol
- um núcleo central ('core') formado por um heptassacarídeo  $\text{Gal}(\alpha 1,6)\text{Gal}(\alpha 1,3)\text{Gal}(\beta 1,3)[\text{Glc}(\alpha 1)-\text{PO}_4]\text{Man}(\alpha 1,3)\text{Man}(\alpha 1,4)\text{GlcN}(\alpha 1,3)$
- uma região de repetições de dissacarídeos fosforilados  $\text{Gal}(\beta 1,4)\text{Man}(\alpha 1)-\text{PO}_4$
- um pequeno oligossacarídeo neutro formando uma estrutura do tipo 'cap'.

As análises estruturais do LPG de várias espécies de *Leishmania* indicam a conservação completa da âncora lipídica (Orlandi, Jr. & Turco, 1987) e uma grande conservação da porção central. Porém, a composição, o número de açúcares da região de unidades repetitivas e a presença do 'cap' podem variar entre as espécies estudadas (Turco & Descoteaux, 1992). Esta variabilidade parece ser importante para a adesão das espécies de *Leishmania* no intestino médio de seus vetores tornando a transmissão do parasito espécie específica (Sacks e cols., 2000; Sacks, 2001; Pimenta e cols., 1994).

Além da variabilidade estrutural entre espécies de *Leishmania*, sabemos que ocorre diversidade também entre as formas do parasito. Formas infectantes do protozoário, promastigotas metacíclicas, possuem LPGs com ramificações diferentes e estruturalmente mais alongados, com maior número de resíduos de galactose e manose, quando comparados com a forma promastigota procíclica (Sacks e cols., 1995; Soares e cols., 2005). Portanto, o LPG está envolvido no processo de metaciclogênese estando relacionado com a infectividade do parasito.

Outros componentes da superfície de protozoários possuem domínios semelhantes ao LPG (revisados por (Turco & Descoteaux, 1992):

- proteases de superfície gp63- que é ancorada por GPI



- proteínas secretadas como proteofosfoglicano de mucina livre (PPG)- constituídos de unidades repetidas de dissacarídeos e estrutura ‘cap’ ligada a uma proteína;
- fosfoglicanos extracelulares secretados (PG)- com polímeros de dissacarídeos fosfatados e uma estrutura ‘cap’;
- glicosilinositolfosfolípide (GIPLs)- composto de uma estrutura lipídica que funciona como âncora fixando uma unidade de sacarídeos (manose e galactose) fosfatados.

Um grande interesse tem sido direcionado aos mecanismos de biossíntese do LPG, de modo a se desenvolver drogas que possam atuar neste processo. Pouco se sabe a respeito da síntese da âncora lipídica em *Leishmania* e inferências foram estabelecidas a partir da comparação com outros organismos (Turco & Descoteaux, 1992). O conhecimento sobre a porção glicídica central foi deduzido a partir da análise estrutural dos glicofosfolípides (GIPLs) isolados de várias espécies de *Leishmania* (McConville & Blackwell, 1991).

Em *Leishmania* a adição do primeiro resíduo de manose à N-acetilglicosamina-Pi provavelmente daria origem a Man( $\alpha$ 1,4)GlcN-PI, precursor do LPG e outras proteínas ancoradas à GPI. A adição do segundo resíduo de manose é um evento chave na biossíntese de glicoconjugados de *Leishmania*. No caso da gp63, a adição de três resíduos de galactose formaria Man( $\alpha$ 1,6)Man( $\alpha$ 1,4)GlcN-PI, enquanto no LPG ela formaria Man( $\alpha$ 1,3)Man( $\alpha$ 1,4)GlcN-PI (Schneider e cols., 1990). Para o LPG, a adição de 3 resíduos de galactose, sendo um deles galactofuranose, continuaria o processo.

### **1.7. O papel do lipofosfoglicano (LPG) na interação com hospedeiro invertebrado**

Vários trabalhos descreveram o papel do LPG na interação com os hospedeiros vertebrados e invertebrados (Sacks & Kamhawi, 2001). Esta molécula é o glicoconjugado majoritário da superfície de *Leishmania*, estando presente inclusive no flagelo. Dentre os glicoconjugados já descritos, apenas o LPG foi identificado até hoje como importante na adesão ao epitélio do intestino médio do vetor.

Schlein e colaboradores (1990) mostraram que o LPG de *L. major* inibe a síntese de enzimas proteolíticas pelo epitélio intestinal de *P. papatasi*. Posteriormente, Pimenta e

colaboradores (1992) e Sacks e colaboradores (1994) demonstraram que o LPG também protege o parasito de um ataque direto das enzimas proteolíticas e favorece a adesão ao epitélio impedindo que sejam excretados após a digestão.

A variabilidade da estrutura do LPG também estabelece uma interação espécie específica entre *Leishmania*-flebotomíneo (Pimenta e cols., 1994). Estas evidências foram confirmadas por outros autores utilizando mutantes deficientes na síntese de LPG. Butcher e colaboradores (1996) e Sacks e colaboradores (2000) mostraram que mutantes de *L. major* e *L. donovani*, obtidos através de tratamento químico, não foram capazes de manter a infecção nos flebotomíneos. Entretanto, a infectividade foi restaurada após a adição do plasmídeo contendo o gene complementar.

Além disso, é importante ressaltar o papel do LPG na proteção da *Leishmania* frente às condições adversas do tubo digestivo. Trabalhos com *L. major* e *L. donovani* mostram que modificações na estrutura do LPG são importantes para a diferenciação do parasito de promastigota para metacíclica (Descoteaux & Turco, 1999; Descoteaux & Turco, 2002).

### **1.8. A importância dos glicoconjugados na interação com hospedeiro vertebrado**

Mais recentemente, diferentes estudos demonstraram também a importância destas moléculas como ativadores inespecíficos de linfócitos B, assim como da resposta imune inata. Estes estudos estão de acordo com a hipótese de que estes glicoconjugados podem atuar como adjuvantes naturais, envolvidos na indução da resposta imune durante a infecção por estes tipos de parasitas. Por outro lado, a ativação exagerada do sistema imunológico por estas moléculas, pode ser responsável pela imunopatologia observada nas infecções com *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma cruzi*, por exemplo.

Estas estruturas expressas na superfície do parasito interagem diretamente com as células do hospedeiro, tal interação modula fatores de resistência e/ou susceptibilidade a infecção. As âncoras têm como função ligar moléculas de superfície celular à membrana do parasito. Por outro lado, a distribuição em abundância destas moléculas em regiões de interface entre o parasito e o hospedeiro pode revelar importante função nesta interação.

Existe uma grande discussão acerca da função do LPG e PPGs. Alguns trabalhos defendem a idéia que tais moléculas podem favorecer o parasito, estando diretamente relacionado ao mecanismo de escape do protozoário à resposta imune do hospedeiro.

Spath e colaboradores mostraram em uma série de trabalhos a interação com o hospedeiro vertebrado após inoculação do vetor. Parasitos deficientes em LPG mostraram-se sensíveis ao ataque de componentes do soro humano e a explosão oxidativa do macrófago, além de se revelarem incapazes de inibir a fusão do fagolisossoma imediatamente após penetração na célula hospedeira. Estes dados revelam a importância do LPG no estabelecimento da infecção e na sobrevivência do parasito no hospedeiro vertebrado (Spath e cols., 2003a; Spath e cols., 2000; Spath e cols., 2003b).

Piani e colaboradores (1999) mostraram que macrófagos intraperitoneais diminuem a produção de TNF e NO quando expostos a LPS e PPGs de *L. major*. Além disso, outros trabalhos mostram que em *L. donovani*, o LPG e suas unidades repetitivas de carboidratos, são capazes de inibir o processo de fusão do fagossoma com o lisosoma do macrófago remodelando o fagolisossoma. Promovendo o escape do parasito a explosão oxidativa da célula hospedeira (Desjardins & Descoteaux, 1997; Lodge e cols., 2006).

Por outro lado, outros trabalhos demonstram que o LPG e outros glicolípides podem atuar como ativadores da resposta imune do hospedeiro. Mais recentemente, diferentes estudos têm demonstrado a importância de estruturas glicolípídicas como ativadores de células da resposta imune inata. As características estruturais da molécula e sua âncora GPI permitem a ligação a receptores Toll-like (TRL), responsáveis pela regulação da resposta imune inata de mamíferos (Pasare & Medzhitov, 2004). Portanto, a molécula de LPG de *L. major* pode ativar receptores do tipo Toll 2 de células NK ativando tais células na produção de IFN- $\gamma$ , citocina que é mediador crucial para a resistência inata contra o parasito (Becker e cols., 2003).

Outra função desempenhada pelo LPG de *L. major* é na indução da produção de citocinas (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e na modulação da produção de mediadores de inflamação como IL-1 $\beta$ , IL-12 e CD25, LFA-1, CR-3, CR-4, L-selectina, CD31, CD31, ICAM-1, VCAM (Rosenthal e cols., 1996; Brittingham & Mosser, 1996). Segundo Proudfoot (1996), em *L. major* frações do LPG e PGs induzem, em sinergia com IFN $\gamma$ , a produção da enzima

iNOS (óxido nítrico sintetase induzível) por macrófagos da linhagem J774 e consequentemente aumentam a produção de NO.

Estruturas glicolípídicas podem atuar de maneira oposta em macrófagos devido ao grau de maturação e de ativação destas células (Piani e cols., 1999). Além disto, a própria diversidade estrutural destas moléculas faz com que as funções do LPG e outros glicolípides sejam espécie-específicas, promovendo grande diversidade de respostas e interações com as células do hospedeiro.

Apesar desta grande divergência na função desenvolvida por glicolípides na interação parasito-hospedeiro, tais moléculas têm grande papel e influência direta no estabelecimento do parasito e na resposta imune desenvolvida.

Grande parte dos estudos de glicobiologia de *Leishmania* são desenvolvidos em espécies de parasitos do Velho Mundo. Pouco se sabe sobre o LPG, e suas interações, de espécies causadoras de Leishmaniose Cutânea no Novo Mundo, como por exemplo, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Portanto, estudos que esclareçam o papel do LPG, principalmente de espécies do Novo Mundo, são de extrema importância para se elucidar os mecanismos imunológicos que desencadeiam a cura e/ou a resistência ao protozoário.

Além disto, as distintas espécies de *Leishmania* causam uma diversidade de respostas imunológicas e consequentemente de patologias. Neste sentido, através deste trabalho, procuramos elucidar a participação do LPG de *Leishmania*, em vista da sua variabilidade estrutural e funcional, nos mecanismos imunológicos responsáveis pela diversidade de manifestações clínicas desenvolvidas em infecções por *L. braziliensis* e *L. amazonensis*.

## ***2. Objetivos***

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar o papel do LPG de *Leishmania amazonensis* e *L. braziliensis* na virulência e infectividade do parasito e seu papel na modulação da resposta imune em camundongos C57BL/6.

### 2.2. Objetivos Específicos

- a) Purificar o LPG de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em fase estacionária de cultura.
- b) Verificar a influência do LPG de *L. amazonensis* e de *L. braziliensis* no perfil de infectividade de parasitos do gênero *Leishmania* no modelo murino.
- c) Avaliar as alterações no perfil de resposta imune desenvolvida por células do baço e linfonodo de camundongos C57BL/6 infectados com *L. braziliensis* na presença do LPG das duas espécies.
- d) Observar o perfil de ativação de macrófagos intraperitoniais frente ao LPG de *L. amazonensis* ou de *L. braziliensis*
- e) Avaliar as alterações provocadas pela presença do LPG na ativação por LPS e IFN- $\gamma$  em macrófagos intraperitoneais de camundongos.
- f) Determinar o papel de receptores do tipo Toll 2 nas alterações provocadas pela presença de LPG purificado de *L. amazonensis* “*in vitro*”.

### ***3. Material e Métodos***

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Cepas de *Leishmania* utilizadas e obtenção de antígenos

Foram utilizadas neste estudo as cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) de referência da Organização Mundial de Saúde. Formas promastigotas foram cultivadas em estufa a 25°C, em meio de Grace (GIBCOBRL- Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) diluídos em água milliQ, acrescido de 10% soro fetal bovino (Cripion Biotecnologia - Andradina, SP, BR), 100 unidades/mL penicilina G (Sigma - Sigma Chemical, CO, St Louis, MO, USA), 100µg/mL streptomina (Sigma - Sigma Chemical, CO, St Louis, MO, USA) e 2mM L-glutamina (GIBCOBRL- Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) com pH 6,5.

Para a obtenção do antígeno particulado de *Leishmania* culturas de cinco dias foram submetidas à centrifugação (1540xg por 10 min), lavadas em salina tamponada com fosfato (PBS) estéril, novamente centrifugado, repetindo-se o procedimento de lavagem duas vezes. O sedimento celular foi então submetido a aquecimentos em banho-maria e resfriamentos em N<sub>2</sub> líquido sucessivos, promovendo a lise celular. As proteínas foram dosadas pelo método de Lowry (LOWRY e cols., 1951). Os extratos foram preparados na concentração de 1mg/mL e estocados a -20°C para serem utilizados como estímulo em cultura de células de baço e linfonodo.

#### 3.2. Extração e Purificação de lipofosfoglicanos (LPG) de *Leishmania* (Orlandi, Jr. & Turco, 1987).

Os LPGs de *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* foram extraídos de acordo com metodologia descrita por (Orlandi, Jr. & Turco, 1987) com utilização de solventes orgânicos e coluna de Phenil-sepharose CL-4B (Sigma - Sigma Chemical, CO, St Louis, MO, USA). No quinto dia de cultura os parasitos foram lavados em PBS e centrifugados a 1540xg por 10 minutos, ao sedimento foram adicionados 2,5 mL Clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) /Metanol (3:2) e 0,5 mL cloreto de magnésio P.A (MgCl<sub>2</sub>) 4 mM. Após exposição ao ultrasom (Branson Sonifer 250) o material foi centrifugado a 1380xg por 14 minutos. A



centrifugação separa o material em uma fase sólida intermediária e duas fases aquosas, uma superior e uma inferior que foram descartadas. Repetiu-se a extração. À fase sólida intermediária adicionaram-se 2,5 mL de  $MgCl_2$  4 mM, sonicou-se e centrifugou-se novamente sob mesma rotação por duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foram adicionados na primeira centrifugação 0,5 mL de  $CHCl_3$ /Metanol (1:1) e 3 mL de  $CHCl_3$ /Metanol/ $H_2O$  (10:10:3) para segunda e terceira centrifugações. O sobrenadante obtido contém GIPLs.

Para extrair o LPG do sedimento resultante foram acrescentados 2,5 mL de ESOAK (água/etanol/etiléter/piridina/ $NH_4OH$ ) (15:15:5:1:0,017). Após exposição ao ultrassom e centrifugação por 3 vezes a solução contendo LPG foi separada e evaporada utilizando nitrogênio gasoso em banho a 45°C. O material foi ressuscitado em 1 mL de 0,1N HAc/0.1N NaCl, sonificado e aplicado em coluna de fenil-sefarose.

Após aplicação da amostra contendo LPG a coluna hidrofóbica foi lavada de acordo com a seguinte seqüência: 1 mL de 0.1 N HAc; 1 mL de  $H_2O$  (GIPLs); 6 mL de ESOAK. As moléculas hidrofóbicas que se ligaram à resina foram eluídas com ESOAK, eluindo consequentemente o LPG extraído.

As frações contendo LPG foram novamente evaporadas em nitrogênio gasoso e banho a 45 °C, ressuscitadas em 1 mL de água milli-Q, sonicadas por 10 minutos e submetidas a filtração estéril. O LPG purificado e esterilizado foi mantido a 4°C. As amostras obtidas foram submetidas à identificação por Dot-blotting com anticorpo específico e à dosagem de carboidratos pelo método fenol-ácido sulfúrico (Dubois M. e cols., 1956).

### **Identificação da fração com LPG por Dot-blotting**

Para identificação das frações purificadas de LPG foi utilizada membrana de transferência de fluoreto de polivinilideno (PVDF 0,45  $\mu m$ , Biotrece) umedecida em metanol puro e colocada em aparelho de filtração Bio-Dot (Bio-Rad Headquarters, Hercules, CA, USA). Foram utilizados 100  $\mu L$  de cada amostra para sucção por bomba de vácuo. Como controle positivo foram utilizados 10  $\mu L$  de antígeno total de *Leishmania* na concentração de 1mg/mL. A membrana com material retido em sua superfície foi incubada em solução de bloqueio (PBS e 0,3% de Tween 20) por 30 min. à temperatura ambiente.

Foi feita a incubação com IgG de camundongo anti-LPG que reconhece a porção conservada do LPG (CA7AE) (Tolson e cols., 1989) com diluição (1:1000) em PBS/0,05% Tween 20 por 18h a 4°C. Após a lavagem por 30 minutos em Salina/0,05% Tween 20 (Polioxietilenosorbitano monolaurato – Labsynth, Dadema – SP, BR) o material foi incubado com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição de (1:2500) em PBS/0,05% Tween 20 por 2h a temperatura ambiente. Após nova lavagem a reação foi revelada com 3,3'-Diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetraaminobifenil)- DAB (Sigma - Sigma Chemical, CO, St Louis, MO, USA), 4-cloro-1-naftol (Sigma - Sigma Chemical, CO, St Louis, MO, USA) diluídos em PBS e metanol, adicionando-se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Com o aparecimento da reatividade, a reação foi interrompida com água.

### **Dosagem de carboidratos pelo método fenol-ácido sulfúrico (Dubois M. e cols., 1956)**

Foi construída uma curva padrão de carboidratos (manose/galactose) variando de 0 à 100µg/mL de carboidrato. As amostras foram diluídas (1:10) em água para dosagem. Adicionaram-se 12,5µL de fenol 80% e 1,25 mL de ácido sulfúrico concentrado diretamente sobre as amostras e nos tubos contendo os padrões. Após 20 min a reação foi medida em leitor de ELISA (Emax - Molecular Devices – Sunnyvale, CA, EUA) com filtro de 490nm. Com auxílio do programa SOFTmax foi feito o cálculo para concentração da amostra por comparação com a curva de regressão linear montada (concentração x densidade ótica).

### **3.3. Animais experimentais**

Foram utilizados camundongos C57BL/6 com idade média entre cinco e oito semanas, provenientes de colônias do Biotério da UFOP ou provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os camundongos TRL2-/- utilizados nos experimentos foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Para controle dos animais foi feita RT-PCR para o receptor Toll do tipo 2, verificando que as células destes animais não produzem mRNA para a proteína, o que confirma o nocaute. Para os experimentos “*in vivo*” foram utilizadas fêmeas de camundongos e para os experimentos “*in vitro*” os machos.

### 3.4. Experimentos “*in vitro*”

#### Obtenção de macrófagos intraperitoneais

C57BL/6 e TLR2-/- foram inoculados com 2mL de meio tioglicolato 3% no peritônio. Após cinco dias, foi feita a lavagem intraperitoneal em meio DMEM (Hyclone – Logan, Utah, EUA) acrescido de 1% de soro fetal bovino (Cultilab - Campinas, SP, BR), 100 unidades/mL penicilina G (Sigma - Sigma Chemical, CO, St Louis, MO, USA), 100µg/mL streptomina (Sigma - Sigma Chemical, CO, St Louis, MO, USA), 2mM L-glutamina (GIBCOBRL- Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), 50µM de 2-mercaptoetanol (Pharmacia Biotech – Uppsala, Suíça) e 25mM de HEPES com pH 7,2 para retirada das células.

#### Cultura de macrófagos intraperitoneais para RT-PCR, citometria e dosagem de citocinas

Para cultura as células do peritônio foram contadas, centrifugadas e a concentração ajustada para  $10^6$  células/mL em meio DMEM, semelhante ao descrito acima, porém com 10% de soro fetal bovino. Foram utilizadas placas de petri ou placas de 48 poços de poliestireno para aderência dos macrófagos e após 90 minutos em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C as placas foram lavadas com PBS para retirada de células não aderidas.

Para os ensaios sem ativação as células de camundongos C57BL/6 foram cultivadas em placas de 48 poços em meio de cultura na presença ou ausência de LPG em três concentrações 1µg/mL , 10µg/mL e 50µg/mL. Os testes foram feitos em triplicata. Após cultivo dos macrófagos intraperitoneais “*in vitro*” durante 72h, nos ensaios sem ativação, o sobrenadante foi armazenado a -20°C e feita a extração de RNA, segundo protocolo a ser descrito.

Para os ensaios de ativação utilizando células de camundongos C57BL/6 e de TLR2-/- fez-se a extração dos macrófagos aderidos na placa com imersão em gelo e PBS gelado. Após nova contagem das células retiradas e centrifugação, os macrófagos foram mantidos em cultura em tubos de polipropileno para não ocorrer aderência. Ao meio de cultura foram adicionados 4U/mL de rmIFN-γ (R&D Systems Inc.- Mineapolis, MN, EUA)

e 100pg/mL de LPS (lipolissacarídeo obtido de *E. coli*, Sigma Chemical - CO, St Louis, MO, USA), na ausência ou presença de LPG de *L. amazonensis* ou de *L. braziliensis* em três concentrações 1µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL. Foram utilizadas como controle culturas sem ativação, com ativação apenas por LPS, apenas por IFN-γ ou com ativação por LPS e IFN-γ. Todos os testes foram feitos em duplicata. As células mantidas em cultura por 48h foram centrifugadas, o sobrenadante armazenado a -20°C para posterior dosagem de citocinas e NO, e as células utilizadas para citometria de fluxo.

Para todos os ensaios após 24h de cultura, 35µL do sobrenadante de cada teste foi coletado, em duplicata, armazenado a -80°C para posterior bioensaio de TNF.

### 3.5. Experimentos “*in vivo*”

#### **Separação da forma promastigota metacíclica de cultura de *Leishmania braziliensis* para infecção “*in vivo*”**

Formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* foram cultivadas durante cinco dias em meio Grace Suplementado, descrito acima. As culturas de células foram lavadas em PBS estéril por duas vezes, foram ressuspensas na concentração de  $1-2,5 \times 10^8$ /mL em DMEM e adicionado 2mL de PBS/ficcol 10% (Ficoll 400, Sigma - Sigma Chemical, CO, St Louis, MO, USA) a cada 2mL de cultura para formação de gradiente. Após centrifugação de 1070xg/25°C/15min o sobrenadante contendo as formas metacíclicas foi utilizado para infecção em camundongos C57BL/6 e o precipitado, contendo promastigotas morta e formas procíclicas, descartado (Spath & Beverley, 2001).

Foi feita infecção intradérmica em 4 animais por grupo com  $1 \times 10^5$  formas metacíclicas de *L. braziliensis* na orelha esquerda, com ou sem adição de LPG purificado de promastigotas de *L. amazonensis* ou de *L. braziliensis*. A quantidade de LPG inoculada foi igual a quantidade de LPG presente na superfície de  $1 \times 10^5$  parasitos de *L. major* reportado por McConville & Bacic (1990). Segundo este trabalho, em  $1 \times 10^6$  parasitos de *L. major* são encontrados aproximadamente 0,150µg de LPG, portanto, utilizamos 0,015 µg para  $1 \times 10^5$  parasitos.

Durante 8 semanas foram feitas medidas da lesão, em mm, com auxílio de paquímetro digital, fazendo-se a diferença entre a orelha infectada e a não infectada.

### **Processamento, retirada e cultura de células dos órgãos linfóides**

Na oitava semana de infecção os animais foram sacrificados. Os órgãos linfóides, baço e linfonodo drenante, foram retirados e submetidos a processamento para isolamento de células. A maceração dos órgãos foi feita em meio DMEM (Hyclone – Logan, Utah, EUA) acrescido de 1% de soro fetal bovino (Cultilab - Campinas, SP, BR), 100 unidades/mL penicilina G (Sigma - Sigma Chemical, CO, St Louis, MO, USA), 100µg/mL streptomina (Sigma - Sigma Chemical, CO, St Louis, MO, USA), 2mM L-glutamina (GIBCOBRL- Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), 50µM de 2-mercaptoetanol (Pharmacia Biotech – Uppsala, Suíça) e 25mM de HEPES com pH 7,2.

Após maceração as células do baço foram submetidas durante 2 min a solução composta por Tris base 17 mM e cloreto de amônio 144mM para lise de hemáceas. Tanto para o baço quanto para o linfonodo foi feita contagem de células em azul de tripan, feita centrifugação e a concentração acertada para  $5 \times 10^6$  células/mL em meio semelhante ao descrito acima porém, com 10% de SFB.

Em placas de cultura de 48 poços foram adicionados 500µL/poço da suspensão de células sem ou com estímulo de 50µg/mL de antígeno particulado de *L. braziliensis*. Após 24h de cultura o sobrenadante foi coletado para bioensaio de TNF e com 72h de cultura o sobrenadante foi coletado para dosagem de outra citocinas.

Cada baço foi macerado isoladamente e as células colocadas em cultura em duplicata. Para os linfonodos fez-se “pool” de dois animais para se obter quantidade de células suficiente para cultura em duplicata.

### **Quantificação de parasitos na lesão**

Com 8 semanas de infecção as orelhas infectadas dos camundongos C57BL/6 foram extraídas e utilizadas para quantificação de parasitos pela técnica de diluição limitante. Os dois lóbulos das orelhas retiradas foram separados e colocados em 0,5mL de meio DMEM com colagenase tipo II (450pg/mL) durante 1h e meia à 37°C. Os lóbulos foram processados em Grace e centrifugados a 42xg/4°C/1 min para retirada do sedimento do órgão. Após este procedimento, o sobrenadante foi submetido à centrifugação a 1540xg/4°C/10 min para separação dos parasitos. O sedimento foi ressuspendido em 0,5ml

de meio Grace Suplementado, especificado anteriormente, e distribuído em placas de fundo chato de 96 poços. Nos primeiros poços foram adicionados 200µL da suspensão, em duplicata, e no restante 160µL de meio Grace Suplementado. Foram feitas diluições seriadas (1:5) a partir do primeiro poço, sendo transferido 40 µL de um poço para o outro até o 12º poço. As placas de cultura foram mantidas em estufa de 25°C por 15 dias. Observando-se o último poço que continha *Leishmania* estimava-se o número de parasitos presentes na lesão, com 3 parasitos para o primeiro poço, 15 para o segundo, 75 para o terceiro e assim sucessivamente.

### 3.6. Dosagem de citocinas

#### Elisa (enzyme linked immunosorbent assay)

Foram dosadas as citocinas IL-12, IFN- $\gamma$  e IL-10 pelo método de captura imunoenzimático com utilização de placas de ELISA de 96 poços. A dosagem de IL-12p40 e IFN- $\gamma$  foram feitas com utilização de anticorpos monoclonais produzidos no próprio laboratório e como padrão os recombinantes murinos, rmIL-12, rmIFN- $\gamma$  e rmIL-4 (R&D Systems Inc.- Minneapolis, MN, EUA). Já nos ensaios para dosagem de IL-10 utilizou-se o kit de ELISA da PeproTech (PeproTech Brasil FUNPEC, Ribeirão Preto, SP, BR).

As placas de 96 poços foram cobertas com anticorpo de captura específico para cada citocina por 18h a 4°C, bloqueadas com PBS suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) por 30 min em temperatura ambiente. Adicionou-se 100µL de sobrenadante de cultura e como padrão foi utilizado padrão recombinante murino para cada citocina dosada. Feita uma incubação por 2h em temperatura ambiente e lavagem em solução salina/0.05% de Tween 20 por 5 vezes. Após lavagem, adicionou-se o anticorpo secundário diluído em PBS/5% SFB e incubou-se por 1h em temperatura ambiente. Após nova lavagem foi feita incubação com estreptoavidina-peroxidase durante uma hora. A revelação foi feita com ácido 2,2'-bio-azino-3-etilbenzil-tiazol-6-sulfônico (ABTS - Sigma Chemical, CO, St Louis, MO, USA) em tampão fosfato/citrato e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para interromper a reação adicionou-se SDS 1% e a medida das absorbâncias foi feita em leitor de ELISA (Emax - Molecular Devices – Sunnyvale, CA, EUA) a 405nm. Com o programa SOFTmax foi feito o cálculo da concentração da amostra por comparação com a curva de regressão linear montada.

### **Bioensaio de TNF**

Para dosagem de TNF em sobrenadante de cultura de células coletado após 24h foi realizado o bioensaio com linhagem de célula WEHI descrito por Lattime e colaboradores (1988). As amostras e o padrão foram diluídos em meio para WEHI contendo RPMI (Sigma Chemical, CO, St Louis, MO, USA) com pH 7,2, acrescido de 10% de SFB, 2mM de L-glutamina, 100 unidades/mL de penicilina G, 100µg/mL de sulfato de streptomicina e 1mL de solução de aminoácidos não essenciais 100X concentrado (890mg/mL de L-alanina, 1320mg/mL de L-asparagina, 1330mg/mL de ácido aspártico, 1470mg/mL de L-ácido glutâmico, 750mg/mL de L-glicina, 1150 mg/mL de L-prolina e 1050mg/mL de L-serina). Como padrão foi utilizado TNF recombinante murino (rmTNF) (R&D Systems Inc.- Mineapolis, MN, EUA) na concentração de 9,5 ng/mL. Após realização das diluições seriadas do padrão e das amostras em placas de fundo chato estéril de 96 poços, foram adicionadas  $1 \times 10^6$  células WEHI, tratadas com actinomicina D (Sigma Chemical, CO, St Louis, MO, USA). Feita incubação a 37°C / 5% de CO<sub>2</sub> por 24h e adição de brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2]-2.5-difeniltetrazólio (MTT – Sigma Chemical CO. – St. Louis, MO, USA) a 2,5mg/mL como metabólito para detecção de TNF, as placas foram novamente incubadas sob as mesmas condições durante 4h, a seguir, adicionou-se SDS 10% (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, BR) em HCl 0,01M e feita incubação por 16h. A reação foi medida em leitor de ELISA (Emax - Molecular Devices – Sunnyvale, CA, EUA) a 570nm. Do mesmo modo citado anteriormente utilizou-se o programa SOFTmax.

### **3.7. Dosagem de óxido nítrico (NO)**

O NO produzido por macrófagos intraperitoneais foi dosado, como nitrito, por meio do método de Greiss (Green e cols., 1982). Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 48h e foram utilizados em cada ensaio 50µL por poço em duplicata de cada teste realizado. Como padrão, foram utilizados 50µL de nitrito de sódio 250µM, em duplicata, diluído no primeiro poço 1:2 em DMEM e realizadas diluições sucessivas. A reação foi feita adicionando-se 100µL de solução de sulfanamida (1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e dicloreto N-naftil etilenodiamina (0,1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) na diluição de (1:1) durante 10 minutos a temperatura

ambiente. A leitura feita em leitor de ELISA (Emax - Molecular Devices – Sunnyvale, CA, EUA) com filtro de 570nm, com auxílio do programa SOFTmax.

### **3.8. Extração de RNA e realização de RT-PCR de macrófagos intraperitoneais**

Após cultura dos macrófagos por 72h os sobrenadantes foram coletados e guardados para dosagens de citocinas e NO. As células aderidas foram lavadas duas vezes com PBS estéril e realizada a extração de RNA com utilização do kit de Extração da Promega (RNAagents Total RNA Isolation System – Promega - Madison, WI, US). Adicionou-se 40 $\mu$ L/10<sup>6</sup> células de Solução Desnaturante e para cada teste foram feitas triplicatas, após a solução se tornar viscosa o material foi coletado e o volume correspondente às triplicatas, 120 $\mu$ L, foram colocados em tubos de fundo cônico e agitados em vórtex.

Após a lise das células procedeu-se a extração do RNA. Ao material lisado foram adicionados 12 $\mu$ L de Acetato de sódio 2M com pH 4,0, misturados e colocados em gelo. Adicionou-se também, 120 $\mu$ L da fase inferior da solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, feita agitação por 10min. e manutenção em gelo por 15min. O material extraído foi centrifugado 10000xg/4°C/20min. e foi removida a fase aquosa, que contém o RNA, verificando o volume extraído. Foram adicionados isopropanol com volumes equivalentes ao das amostras, feita incubação -20°C/30min. e centrifugação 10000xg/4°C/10min. O sobrenadante foi removido, ao sedimento adicionou-se 0,5mL de etanol 75% e feita centrifugação a 7500xg/4°C/5min. O material foi submetido à secagem ao ar, ressuspendido em água 0,1% DEPC (dietilpirocarbonato) e armazenado a -20°C para posterior RT-PCR.

Para síntese e amplificação do cDNA utilizou-se os reagentes da Invitrogen (Invitrogen- Carlsbad, CA, USA). O RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro e utilizados 2 $\mu$ g de RNA tratados com 0,6 $\mu$ L de DNase para RT-PCR. Ao RNA adicionou-se 1 $\mu$ L de Oligo(dt) 500  $\mu$ g/mL, 1 $\mu$ L de Mix dNTP 10mM (2,5mM para cada dNTP), o volume completado para 12 $\mu$ L com água DEPC e feito aquecimento da mistura por 5min. à 65°C. As amostras foram resfriadas em gelo e feita uma centrifugação breve. Adicionou-se 4 $\mu$ L de “5X First-Strand Buffer”, 2 $\mu$ L de DTT 0.1M, 1 $\mu$ L de RNaseOUT Inibidor de Ribonuclease Recombinante (40u/mL), 1 $\mu$ L de transcriptase reversa (SuperScript II), feita incubação por 1h à 42°C e a inativação da reação aquecendo as amostras a 70°C por 15min.



A partir dos cDNAs obtidos foram feitas reações para detecção do gene HPRT constitutivo, como controle positivo, e para detecção da citocina IL-10. Para amplificação do cDNA foi preparado o MIX contendo: 1,2µL de tampão TAQ, 0,96µL de dNTP, 1µL de cada primer sense e anti-sense para HPRT ou IL-10, 0,04µL de TAQ polimerase e o volume completado para 10µL. A cada 2µL de amostra adicionou-se 10µL do MIX e a reação feita em Termociclador (Mastercycler Personal- eppendorf – Hamburgo, GE). Como controle negativo foi feita reação de PCR para água utilizada no MIX.

Após realização da reação de PCR as amostras foram aplicadas em gel com 6% de acrilamida, tampão TAE, persulfato de amônio e Temed. Além das amostras foram aplicados no gel a amostra de água utilizada nas reações e o padrão de peso molecular com 100pb da LGC (LGC Biotecnologia – Cotia, SP, BR). Após corrida, o gel foi fixado em etanol/ácido acético, corado com solução de nitrato de prata e revelado em solução de NaOH/formaldeído até o aparecimento das bandas.

### 3.9. Citometria de Fluxo

Macrófagos intraperitoneais após 48h de cultura foram lavados, acertada a concentração para  $5 \times 10^5$  células em 50 µL de PBS/1% de Albumina Bovina do Soro (BSA - Sigma Chemical, CO, St Louis, MO, USA) e inativados com 1µg/mL de anti-IgG de rato durante 30 minutos no gelo. Após este procedimento, as células foram lavadas com PBS, novamente acertada a concentração para  $5 \times 10^5$  células em 50 µL de PBS/1% de BSA e incubadas por 30 minutos no gelo com anticorpos específicos fluorescentes (eBioscience - San Diego, CA, USA). Cada tratamento foi marcado com os seguintes anticorpos:

- anti-CD11b de camundongo conjugado com Fluoresceína (FITC), anti-MHC de classe II de camundongo conjugado com Aloficocaina (APC) e anti-CD86 de camundongo conjugado com r-ficoeritrina (PE).
- controles de isotipos, respectivamente, anti-IgG2b de camundongo conjugado com FITC, anti-IgG2b de camundongo conjugado com APC, anti-IgG2a de camundongo conjugado com PE.
- anti-CD11b de camundongo conjugado com FITC e anti-CCR5 de camundongo conjugado com PE.

- seus respectivos controles de isotipos; anti-IgG2b de camundongo conjugado com FITC e anti-IgG de Hamster conjugado com PE.

Após marcação, as células foram novamente lavadas e fixadas em solução de cacodilato de sódio: 10g/L de paraformaldeído (Sigma Chemical - CO, St Louis, MO, USA), 10,2g/L de cacodilato (Sigma Chemical - CO, St Louis, MO, USA) e 6,63g/L de NaCl pH 7,2 para posterior leitura. A leitura foi feita por aparelho de FACS (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e analisados com auxílio do programa CellQuest-Pro (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os gráficos montados foram divididos em quadrantes de acordo com a marcação dos controles de isotipo.

### **Análise Estatística**

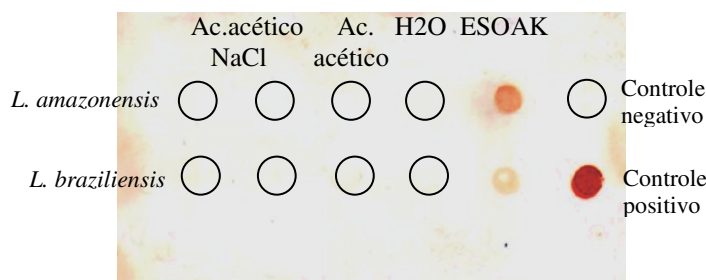
As análises estatísticas para os resultados que apresentaram distribuição normal foram feitas com teste de médias utilizando Teste t de Student. Para avaliar a porcentagem de células positivas nos experimentos de citometria foi utilizado o programa CellQuest e através das porcentagens calculadas para cada quadrante foram geradas médias entre os 3 experimentos e plotadas em gráficos.

## ***4. Resultados e Discussão***

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente concentramos nossos esforços na purificação do LPG de superfície de *L. amazonensis* e de *L. braziliensis* para comparação quantitativa e qualitativa entre as moléculas estudadas. Após a purificação dos LPGs provenientes de parasitos no 5º dia de cultura, foi feita a identificação das frações eluídas em coluna de fenil-sefarose utilizando-se o anticorpo específico CA7AE que reconhece os resíduos de manose-galactose presentes em LPGs tanto de espécies diferentes quanto de estágios diferentes do parasito. Utilizando a técnica de Dot-blotting, segundo metodologia descrita, podemos identificar a presença do LPG de membrana extraído e purificado com o aparecimento de reatividade específica.

A figura 1 contém todo material proveniente da purificação do LPG de *L. amazonensis* (1ª linha) e de *L. braziliensis* (2ª linha). O último poço de cada linha correspondem aos controles negativo e positivo, respectivamente. Observamos reatividades específicas nas frações contendo LPG tanto de *L. amazonensis* quanto de *L. braziliensis* e no controle positivo. As demais frações da coluna que não continham LPG não se mostraram reativas para o anticorpo verificando que a metodologia de purificação utilizada mostrou-se eficiente para as duas espécies de *Leishmania* testadas.



**Figura 1: Identificação por Dotblotting das amostras contendo LPG de duas extrações.** As frações eluídas da coluna de fenil-sefarose foram colocadas no sistema Bio-Dot e sugadas à vácuo, ficando aderidas em membrana de PVDF, sendo incubada com anticorpo específico CA7AE anti-LPG de *Leishmania*. As circunferências identificam todos os poços onde foram aplicadas as frações eluídas na coluna: solução Ác. acético/ NaCl ; solução de Ác. Acético; H2O- água; ESOAK, controle negativo (apenas ESOAK sem passar pela coluna) e controle positivo (antígeno total de *Leishmania*). A reatividade mostra a presença de LPG nas frações. As frações foram obtidas em purificações do LPG de *L. amazonensis* ou do LPG de *L. braziliensis*. Experimento representativo.

**TABELA I** - Dosagens médias dos extratos de LPG obtidos para cada espécie de *Leishmania*.

<b>Dosagens de Carboidratos para cada espécie de <i>Leishmania</i></b>	
<b>Espécies de <i>Leishmania</i></b>	<b>Quantidade obtida por extração 1x10<sup>9</sup> parasitos (µg)</b>
<i>Leishmania braziliensis</i>	121,5
<i>Leishmania amazonensis</i>	215

Todo material purificado foi identificado com anticorpo específico para LPG e aqueles que apresentavam reatividade, exemplificados por frações do ESOAK passadas na coluna de purificação, foram submetidos à dosagem de carboidratos pelo método Fenol-ácido sulfúrico e o restante das frações descartadas.

Com base na dosagem de carboidratos, estimamos a quantidade de LPG extraído de cada  $1 \times 10^9$  promastigotas. Apesar da metodologia utilizada para quantificação do extrato não ser muito precisa observamos um aumento na média da quantidade de LPG obtida nas extrações da espécie de *L. amazonensis* quando comparada às extrações da espécie de *L. braziliensis* (Tabela I).

Diversidades estruturais e/ou quantitativas na proporção de resíduos de galactose/manose ou de outros açúcares presentes nos LPGs de *L. braziliensis* e de *L. amazonensis* podem explicar a diferença encontrada na quantificação dos LPGs. Apesar da estrutura do LPG de *L. braziliensis* já ter sido descrita a de *L. amazonensis* ainda não foi elucidada. Nossos dados colaboram com trabalhos que mostram diversidade na composição do “cap” e na proporção ou sequência de açúcares ligados as regiões de resíduos de Gal(β1,4)Man(α1)-PO<sub>4</sub> (Turco & Descoteaux, 1992).

Turco e colaboradores (1987) e Sacks e colaboradores (1995) descrevem a estrutura de unidades repetitivas do LPG de *L. donovani* composta por resíduos de dissacarídeos fosforilados de manose/galactose sem substituições de açúcares, sendo que, em *L. mexicana* uma em cada cinco repetições possuem ramificações Glcβ1-3 em galactose (Ilg e cols., 1992). Já o LPG de *L. major* possui estrutura mais complexa, de 30 repetições 13% não apresentam açúcares inseridos em várias combinações e proporções de β-D-Gal, β-D-Glic e

$\alpha$ -D-Ara (McConville e cols., 1990). Mais recentemente, o LPG de *L. braziliensis* da cepa (M2903), utilizada em nosso trabalho, foi descrito por Soares e colaboradores (2005) com diferenças estruturais na composição do “cap” e na presença de Glc $\beta$ (1,3) inserida nos resíduos de manose/galactose na proporção de 2:1 do LPG de promastigotas metacíclicas.

Além disto, outros trabalhos verificam diferenças na expressão de LPG na superfície dos parasitos. Muskus e colaboradores (1997) demonstram que em  $10^{10}$  promastigotas de *L. braziliensis* encontram-se 0,1mg de LPG de superfície, nossos dados mostram que em  $10^9$  parasitos encontramos aproximadamente 0,121mg de LPG. Neste mesmo trabalho os autores descrevem que a expressão de LPG de superfície de *L. donovani* é 10 vezes maior que a encontrada em *L. braziliensis*.

Em estudo realizado por Ilg e colaboradores (1992) com a espécie *L. mexicana*, em cada  $10^{11}$  promastigotas são encontrados de 2-3mg de LPG. Nossos dados de quantificação do LPG de *L. amazonensis* mostram que em cada  $10^9$  parasitos obtemos 0,215mg de LPG sugerindo maior proximidade aos valores descritos para *L. mexicana*. Curiosamente, estas duas espécies do parasito estão agrupadas no mesmo complexo, *mexicana*, o que confirma a proximidade entre as espécies.

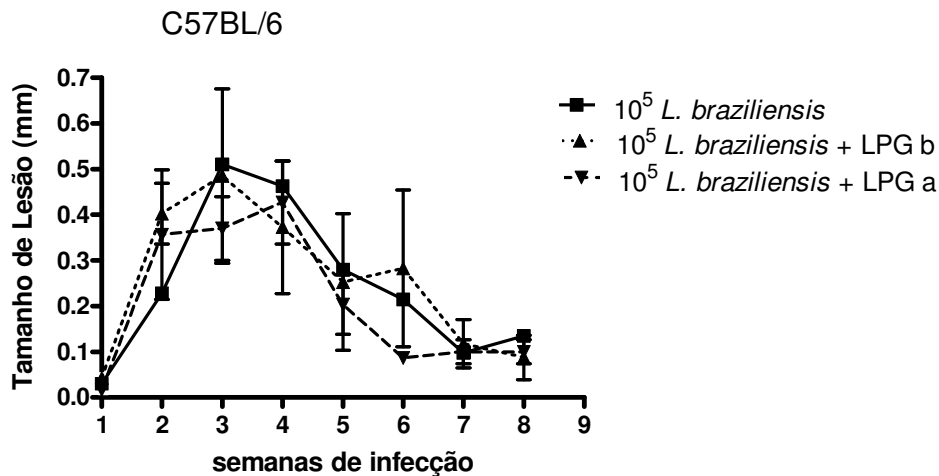
Diversos trabalhos demonstram que a diversidade do LPG pode ser importante no processo de adesão do parasito no intestino médio de seus vetores estabelecendo uma interação espécie específica que confere a sobrevivência do parasito e a eficácia da sua transmissão ao hospedeiro vertebrado (Sacks e cols., 2000; Sacks, 2001; Pimenta e cols., 1994). Além disto, a interação das estruturas de superfície do parasito diretamente com as células do hospedeiro pode assumir diversos padrões quando há variação estrutural do LPG. Estas interações podem modular fatores de resistência e/ou susceptibilidade a infecção (Spath e cols., 2003a; Spath e cols., 2000; Spath e cols., 2003b).

Estudos em nosso laboratório confirmam a diversidade na infectividade de parasitos da espécie de *L. braziliensis* e de *L. amazonensis* no modelo murino. Em camundongos C57BL/6 observamos que *L. amazonensis* promove lesões progressivas podendo levar a ulceração do tecido infectado, porém *L. braziliensis* promove lesões que se curam espontaneamente (Maioli e cols., 2004). Portanto para elucidar a influência da variabilidade do LPG destas espécies de *Leishmania* na infecção “*in vivo*” camundongos C57BL/6 foram infectados com  $1 \times 10^5$  *L. braziliensis* na orelha esquerda na presença ou na ausência de LPG

de *L. braziliensis* ou de LPG de *L. amazonensis*. Durante 8 semanas mediu-se a lesão e fez-se a diferença entre a orelha infectada e a não infectada.

Na figura 2 podemos observar a curva de lesão desenvolvida por camundongos C57BL/6 verificando que a presença de LPG tanto de *L. braziliensis* quanto de *L. amazonensis* não altera o perfil de infecção por *L. braziliensis*, marcado por lesões progressivas até a terceira semana e que vão diminuindo até atingir a cura espontânea na sétima semana de infecção.

Alguns trabalhos com *Leishmania* mutante evidenciam que a presença de glicolípidos de superfície é essencial para virulência do parasito “*in vivo*”. Mensa-Wilmot (1999) verifica que *L. amazonensis* (LV78) deficiente na âncora de GPI tem menor virulência em hamsters. Späth e colaboradores (2000) colaboram com estes resultados mostrando que *L. major* deficiente em LPG produz lesões menores em camundongos BALB/c que a *Leishmania* não mutada.



**Figura 2:** Curvas de lesão desenvolvidas por camundongos C57BL/6 (B6) infectados na orelha esquerda com  $10^5$  *L. braziliensis* (Lb) com ou sem LPG de *L. braziliensis* (LPG b) ou de *L. amazonensis* (LPG a). Os dados são referentes a um experimento representativo de dois. Dados representam média  $\pm$  desvio padrão de grupos de 4 animais.

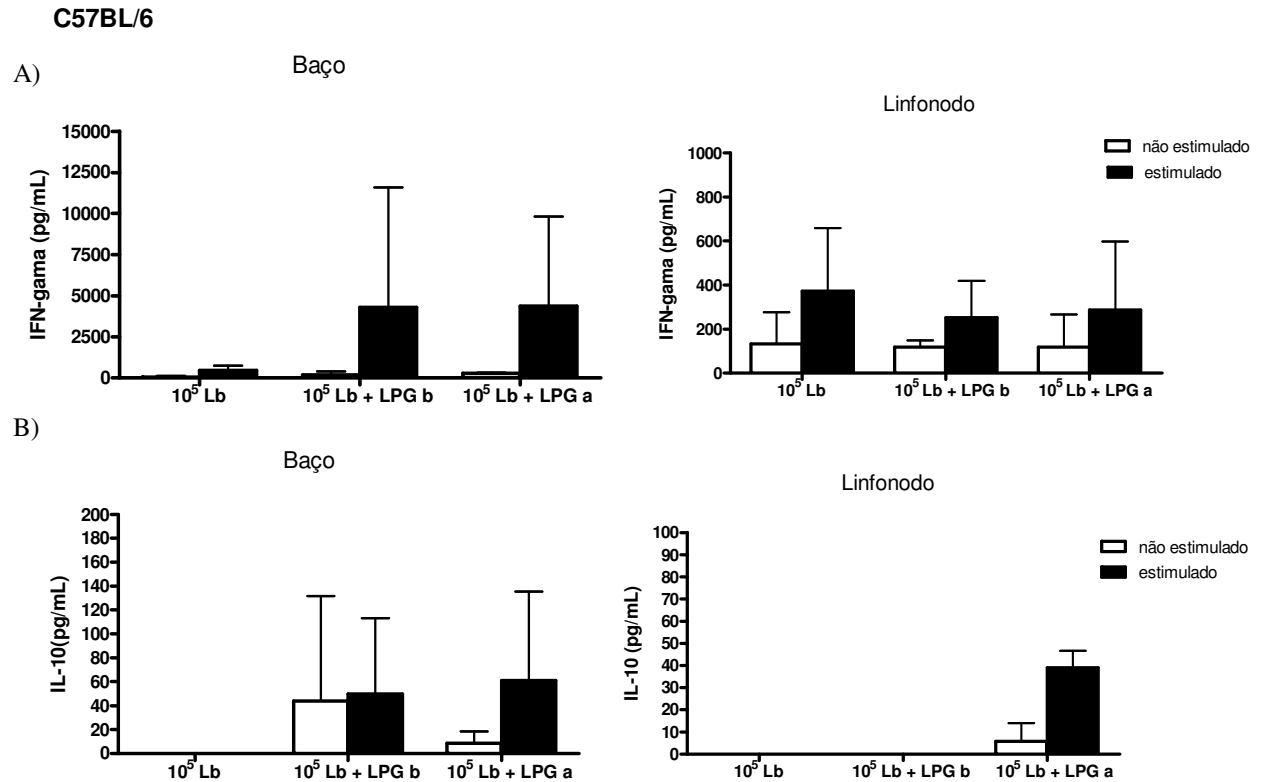
Porém, nossos resultados demonstraram que a presença do LPG de *L. amazonensis* ou o excesso de LPG de *L. braziliensis* em infecções por *L. braziliensis* não alteram o perfil de virulência do parasito. Nossos resultados demonstram similaridades a outros trabalhos da literatura. Em estudo com *L. mexicana* deficiente na âncora GPI foi observado que esta molécula e conseqüentemente os glicolípides formados a partir de GPI ancorado não são essenciais na virulência do parasito tanto em macrófagos “*in vitro*” quanto em camundongos “*in vivo*” (Hilley e cols., 2000; Ilg, 2000). Novamente nossos dados confirmam resultados obtidos em estudos com glicolípides e LPG de *L. mexicana*.

Apesar de não observarmos diferenças no perfil de infectividade em camundongos na presença de LPG decidimos investigar os níveis de citocinas produzidas por células derivadas do linfonodo drenante da lesão e do baço destes camundongos após a oitava semana de infecção. Para isto, os animais foram sacrificados, as células provenientes do baço e linfonodo de cada camundongo foram processadas e colocadas em cultura estimuladas ou não com antígeno particulado de *L. braziliensis*. O sobrenadante foi coletado para dosagem da citocina TNF após 24h de cultura e após 72h para dosagem de IL-10 e IFN- $\gamma$ .

Quando comparamos a produção de IFN- $\gamma$  por células estimuladas do baço do grupo infectado somente com *Leishmania* (462 pg/mL  $\pm$  287) e dos grupos infectados com *Leishmania* na presença de LPG (4282,30 pg/mL  $\pm$  7304,0 e 4373,22 pg/mL  $\pm$  5430,05) verificamos que não há diferença significativa entre os dados observados. A grande variabilidade dos dados fez com que não fosse encontrada diferença estatística na média de IFN- $\gamma$  produzida entre os grupos avaliados (figura 3-A). Também no linfonodo, os valores de IFN- $\gamma$  detectados em sobrenadante de células estimuladas do grupo infectado apenas com *Leishmania* (169,13 pg/mL  $\pm$  286,8) não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos valores apresentados pelos grupos infectados com *Leishmania* mais LPG (253,03 pg/mL  $\pm$  166,76 e 287,04 pg/mL  $\pm$  311,07) (figura 3-A).

Apesar de verificarmos que não há diferença significativa nos níveis de IFN- $\gamma$  produzidos por células estimuladas do baço e linfonodo observamos que os níveis de IL-10 se alteram em infecções na presença do LPG.





**Figura 3:** Dosagem de IFN- $\gamma$  e IL-10 em sobrenadantes de cultura de células do baço e do linfonodo drenante de camundongos C57BL/6 (B6) infectados durante 8 semanas com  $10^5$  *L. braziliensis* (Lb) com ou sem LPG de *L. braziliensis* (LPG b) ou de *L. amazonensis* (LPG a). A) Dosagem de IFN- $\gamma$  de células do baço e linfonodo de C57BL/6 após 72h de cultura. B) Dosagem de IL-10 de células do baço e linfonodo de C57BL/6 após 72h de cultura. Barras brancas correspondem às células colocadas em cultura sem estímulo. Barras pretas correspondem às células colocadas em cultura estimuladas com antígeno de *L. braziliensis*. A dosagem foi feita através da técnica de ELISA. Os dados são referentes a um experimento representativo de dois e correspondem às médias entre 4 animais por grupo  $\pm$  desvio padrão. \* teste t com  $p < 0,05$ .

Na figura 3-B podemos observar que ocorre produção de IL-10 por células estimuladas do baço nos grupos infectados com *Leishmania* + LPG tanto de *L. braziliensis* ( $49,716 \text{ pg/mL} \pm 63,44$ ) quanto de *L. amazonensis* ( $61,1275 \text{ pg/mL} \pm 74,35$ ), porém em células estimuladas do linfonodo drenante apenas o grupo infectado com *Leishmania* + LPG de *L. amazonensis* ( $38,962 \text{ pg/mL} \pm 7,729$ ) foi capaz de produzir níveis detectáveis da citocina.

Também foram avaliados os níveis de TNF produzidos pelas células provenientes dos camundongos infectados, porém não foi detectada a presença da citocina no sobrenadante.

Além disto, foi avaliada a quantidade de parasitos no sítio de infecção através da técnica de diluição limitante, descrita anteriormente, não sendo detectada a presença do parasito na lesão na oitava semana de infecção.

Dados da literatura utilizando *Leishmania* mutada demonstram a importância do LPG principalmente no estabelecimento da infecção no hospedeiro mamífero podendo não alterar o perfil de lesão em animais infectados. Nossos dados avaliam a influência do LPG no curso da infecção por *Leishmania* e mostram que o excesso da molécula não altera a curva de lesão do parasito marcada por produções similares de IFN- $\gamma$  e alterações nos níveis de IL-10 produzidos no momento de cura do parasitismo.

A semelhança dos níveis da citocina IFN- $\gamma$ , tanto no baço quanto no linfonodo, entre os grupos analisados vem confirmar a similaridade no desenvolvimento das lesões. Colaborando novamente com dados que mostram que a presença do LPG não altera a infectividade do parasito “*in vivo*” (Hilley e cols., 2000; Ilg, 2000) e conseqüentemente a resposta imune desenvolvida por ele. Estes trabalhos mostram que o LPG de *Leishmania mexicana* não é importante para virulência do parasito, diferentemente do LPG de *L. major* e *L. donovani*.

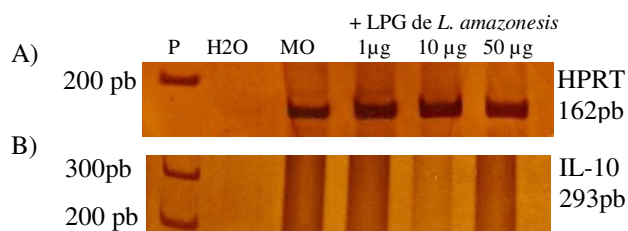
Entretanto a produção de IL-10 nestas células vem demonstrar que o LPG pode agir como fator de direcionamento da resposta imune já que está presente em formas promastigotas que são responsáveis pela infecção das células hospedeiras logo após o repasto sanguíneo do inseto vetor. Trabalhos demonstram que os acontecimentos iniciais em uma infecção e o primeiro contato da *Leishmania* com as células do hospedeiro são cruciais para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora ou que favoreça a persistência do parasito, a ativação deficiente da resposta imune contribui para a patogenicidade da infecção em *L. amazonensis* (Ji e cols., 2003; Jones e cols., 2002; Charmoy e cols., 2007), podendo ser o LPG um dos responsáveis por estas respostas.

Em vista destes resultados avaliamos a influência direta do parasitismo na principal célula hospedeira e célula efetora da resposta imune ao protozoário, o macrófago. Parasitos do gênero *Leishmania* parecem estar relacionados a mecanismos de escape que reprimem as funções normais do macrófago como célula efetora da resposta imune (Gregory & Olivier, 2005a). A fim de avaliar a influencia do LPG de *Leishmania* no estabelecimento da infecção e na ativação de macrófagos intraperitoneais tais células foram retiradas de

camundongos C57BL/6 e incubadas “*in vitro*” com concentrações variadas de LPG purificado. Após 24h de cultura o sobrenadante foi coletado para dosagem de TNF e após 72h coletado para dosagem de NO, foram extraídos RNA das células para detecção da citocina IL-10 por RT-PCR.

Nestes experimentos observamos que macrófagos mesmo em presença de elevadas concentrações de LPG purificado, como 50µg/mL, não produziram quantidades de NO e de TNF detectáveis pelas técnicas utilizadas (dados verificados em dois experimentos).

Os extratos celulares submetidos RT-PCR para detecção de IL-10 foram aplicados em gel de poliacrilamida e corados em solução de nitrato de prata. Como controle positivo da extração foi realizada amplificação do cDNA para o gene constitutivo HPRT, onde observamos a presença de bandas em todas as amostras exceto no controle negativo (água) (figura 4-A). Porém, não observamos a presença de bandas em nenhuma das amostras submetidas à detecção de IL-10 (figura 4-B).



**Figura 4:** Produção de IL-10 por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6 na ausência ou presença de LPG de *L. braziliensis* ou *L. amazonensis*. P- padrão de pares de bases; H2O- água (controle negativo); MO- somente macrófagos; 1µg- macrófagos com 1µg/mL de LPG de *L. amazonensis*; 10µg- macrófagos com 10µg/mL de LPG de *L. amazonensis*; 50µg - macrófagos com 50µg/mL de LPG de *L. amazonensis*; A) Amostras submetidas à detecção de HPRT (162pb) como controle positivo. B) Amostras submetidas à detecção de IL-10 (293pb). Gel de poliacrilamida com coloração pela prata. Experimento representativo de dois, com estímulo de LPG de *L. braziliensis* ou de *L. amazonensis*.

Os mecanismos de ativação do macrófago como célula efetora são marcados por uma cascata de reações que culminam com a produção de intermediários reativos de oxigênio (ROI), de óxido nítrico (NO) e produção de citocinas relacionadas ao mecanismo de ativação da resposta imune ou a mecanismos de regulação (Liew e cols., 1990). Desta forma macrófagos são capazes de eliminar o parasito. Este mecanismo pode ser desencadeado por diversos fatores, como por exemplo, a produção de citocinas

inflamatórias tanto por células da imunidade inata quanto por células da imunidade adaptativa.

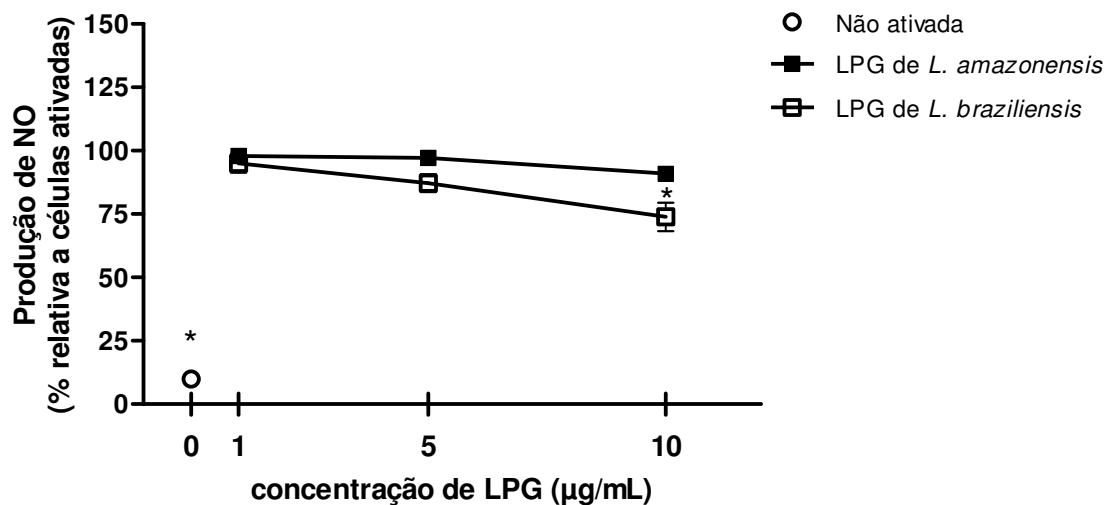
Nossos dados demonstram que o LPG por si só não foi capaz de ativar o mecanismo de eliminação do parasito como produção de NO e de TNF, que também foi demonstrado por Piani e colaboradores (1999) com LPG e PPG de *Leishmania major*. A presença do LPG também não foi capaz de promover a produção de IL-10. Apesar de não terem sido realizados testes para detecção de LPS nas amostras de LPG purificados, nossos extratos revelam certo grau de pureza uma vez que tal contaminação levaria a um aumento da produção de TNF e NO.

A partir de trabalhos que demonstram o papel de glicolípides em células ativadas avaliamos a resposta imune desenvolvida por macrófagos intraperitoneais ativados com IFN- $\gamma$  e LPS em presença de LPG. Macrófagos intraperitoneais foram mantidos em cultura com LPS somente, IFN- $\gamma$  somente, LPS+ IFN- $\gamma$  ou LPS+ IFN- $\gamma$ +LPG de *L. braziliensis* ou de *L. amazonensis*. Após 24h o sobrenadante de cultura foi coletado para dosagem de TNF e após 48h para dosagem de IL-10 e NO.

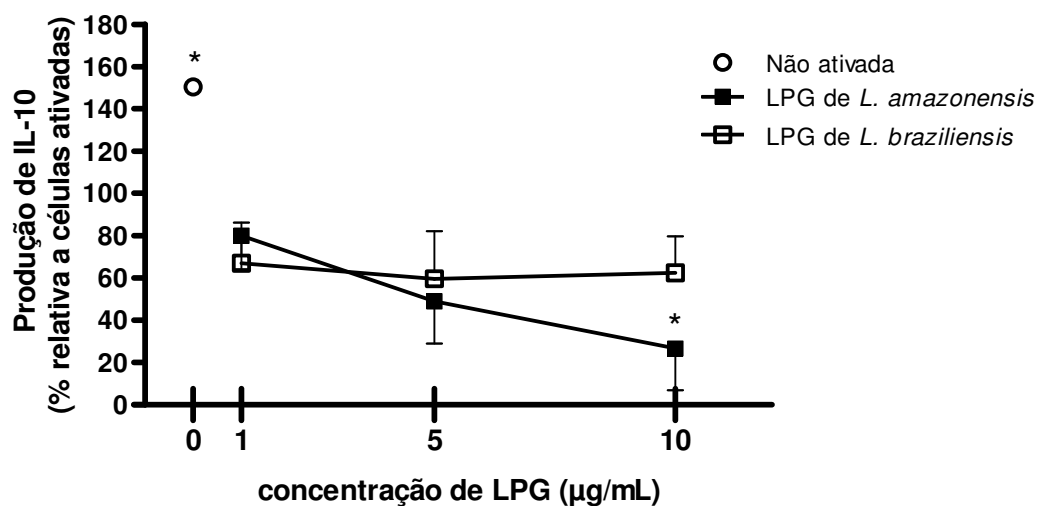
Para avaliar a interferência do LPG sobre produção de NO, no processo de ativação de macrófagos, plotamos os dados referentes às dosagens mostrando a porcentagem da produção de NO em relação ao controle ativado contendo LPS e IFN- $\gamma$ . Apenas como controles internos as dosagens foram feitas em células não ativadas, ativadas apenas com LPS ou apenas com IFN- $\gamma$ .

Podemos observar que a produção de NO por células não ativadas assume valores que correspondem a aproximadamente 12% da produção de NO por células ativadas. Porém, a adição de LPG de *L. amazonensis* em três concentrações diferentes não modifica o perfil de ativação destas células (figura 5- A). Já a adição de LPG de *L. braziliensis* tende a diminuir a produção de NO, sendo observada queda de até 21% da quantidade produzida em relação às células ativadas na ausência de LPG, demonstrando uma relação dose dependente que assume queda significativa com adição de 10 $\mu$ g/mL de LPG ao sistema.

A



B



**Figura 5:** Efeito da adição de LPG sobre a Produção de NO e IL-10 por macrófagos peritoneais ativadas. Macrófagos intraperitoneais provenientes de camundongos C57BL/6 foram estimulados por 48h com 100pg/mL de LPS e 4U/mL de IFN- $\gamma$  (células ativadas) na presença ou ausência das concentrações indicadas de LPG de *L. amazonensis* (quadrado aberto) ou de *L. braziliensis* (quadrado fechado). O círculo aberto corresponde ao controle negativo, célula não ativada. A) Produção de NO. B) Produção de IL-10. Dados correspondem à média + erro padrão de três experimentos independentes. \* representa diferença significativa em relação ao controle positivo  $p < 0,05$  - Teste t de student.

Para avaliar a resposta imune desencadeada pela ativação de macrófagos em presença do LPG de *Leishmania* também verificamos a produção de citocinas. Uma curva dose resposta foi montada com a porcentagem da produção de IL-10 em relação ao controle positivo, células simultaneamente ativadas com LPS e IFN- $\gamma$  (figura 5- B).

Como esperado, a presença de IFN- $\gamma$  diminui em 40% os níveis de IL-10 produzidos por células não ativadas. No entanto, a presença de LPG, em geral, tende a diminuir a produção de IL-10. A adição do LPG purificado de *L. braziliensis* tende a diminuir a porcentagem média de IL-10 produzida, independentemente da concentração de LPG, variando entre 59% à 67% do controle. Porém, a adição do LPG de *L. amazonensis* parece ter efeito dose dependente, atingindo, na maior concentração, 27% do controle com queda significativa de 73% da produção de IL-10.

Também foi avaliada a produção da citocina inflamatória TNF, entretanto, não foi detectada a presença da citocina nos sobrenadantes de cultura analisados.

O estabelecimento da infecção e cura do parasitismo no modelo murino descrito principalmente em trabalhos com *L. major* e *L. donovani*, marcados pela produção de citocinas do Tipo 1, parece não ser o perfil desenvolvido para infecções de espécies do Novo Mundo. Trabalhos com *L. amazonensis* revelam mecanismos mais complexos com intensa regulação da resposta imune do hospedeiro.

Curiosamente, observamos uma queda na produção de NO proveniente de macrófagos ativados em presença de LPG de *L. braziliensis* demonstrando a influência direta do LPG desta espécie na eliminação do parasito pela célula hospedeira, o que não acontece com a adição de LPG de *L. amazonensis*. No entanto esta queda na produção de NO não é acompanhada por alterações na produção da citocina IL-10 mostrando que a citocina não interfere na síntese de NO em macrófagos ativados com IFN- $\gamma$ , LPS e LPG.

Porém, observamos que o LPG proveniente de *L. amazonensis* diminui significativamente a produção de IL-10 de maneira dose dependente em macrófagos ativados e não altera a produção de NO. Isto mostra que a queda de IL-10 não é suficiente para aumentar a produção de NO por esta célula. Este fato pode estar relacionado ao grau de ativação da célula levando a ativação máxima da enzima INOs, responsável pela síntese de NO, e desta maneira a produção de IL-10 não ser suficiente para ter efeito sobre o macrófago. Apesar de vários trabalhos verificarem o papel do LPG como indutor de NO e

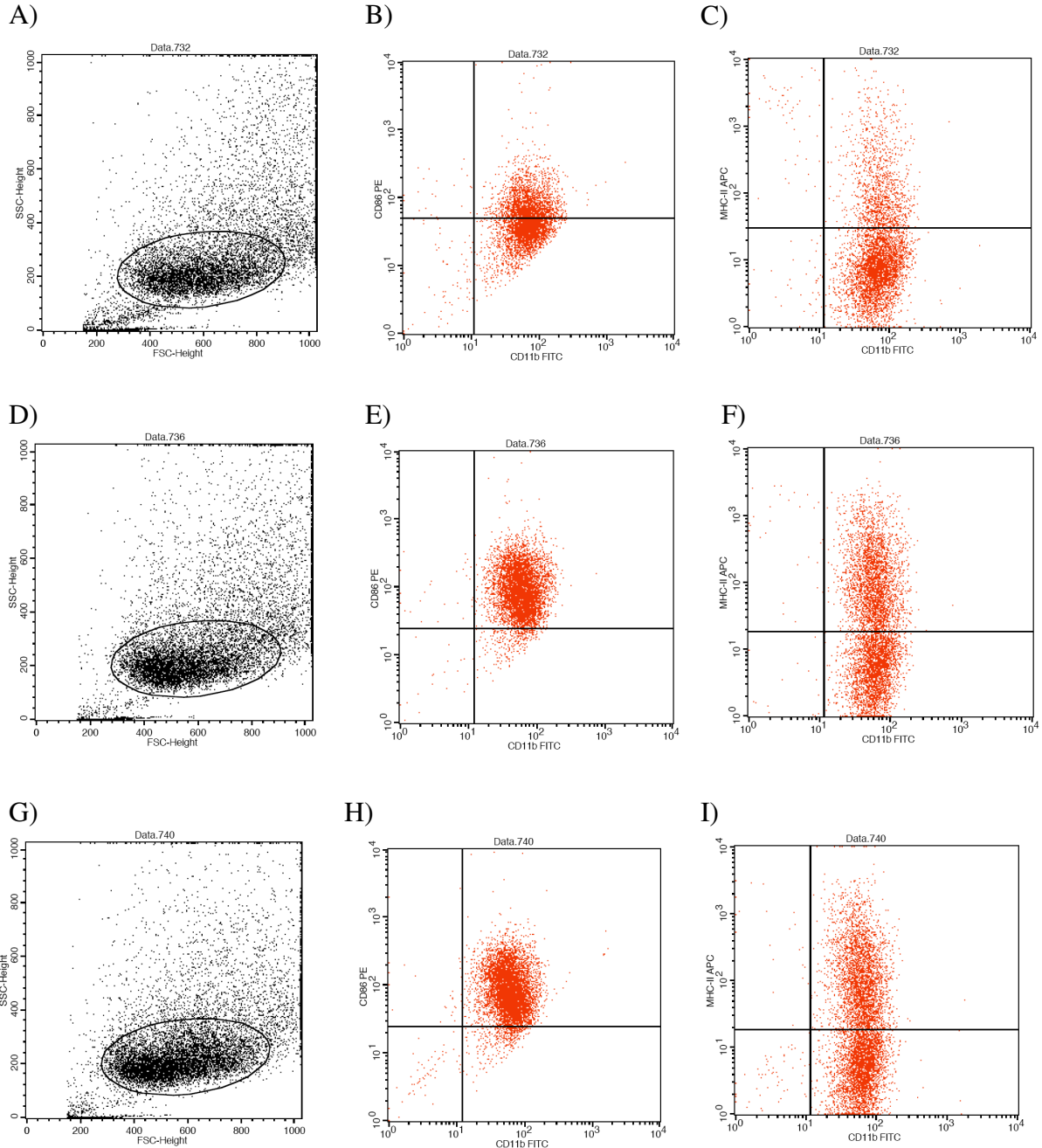
resposta que elimine o parasitismo (Proudfoot e cols., 1996; Kavosi e cols., 2006), segundo Piani e colaboradores (1999), estruturas glicolípídicas podem atuar de maneira oposta em macrófagos devido ao grau de maturação e de ativação destas células podendo ativar mecanismos que possibilitam tanto a evasão do parasito quanto sua eliminação.

Outra especulação sobre estes resultados nos leva ao fato da ativação da enzima INOs não ser dependente da ausência de IL-10. Trabalhos mostram que o aumento da resposta do Tipo 1 na ausência de IL-10 não induz a cura em infecções por *L. amazonensis* (Jones e cols., 2002), não estando relacionado à ausência de IL-10 a mecanismos como produção de NO pela célula hospedeira.

Além disto, a queda de IL-10 provocada pela presença de LPG de *L. amazonensis* pode revelar que a atuação do IFN- $\gamma$  é importante para manutenção deste parasito. Qi e colaboradores (2004) relataram que macrófagos ativados com IFN- $\gamma$  facilitam a replicação de *L. amazonensis* mesmo com produção de NO, confirmando os dados obtidos em nosso trabalho. O efeito do LPG desta espécie na queda da produção de IL-10 por macrófagos ativados facilitaria a presença do parasito mesmo não alterando a produção de NO.

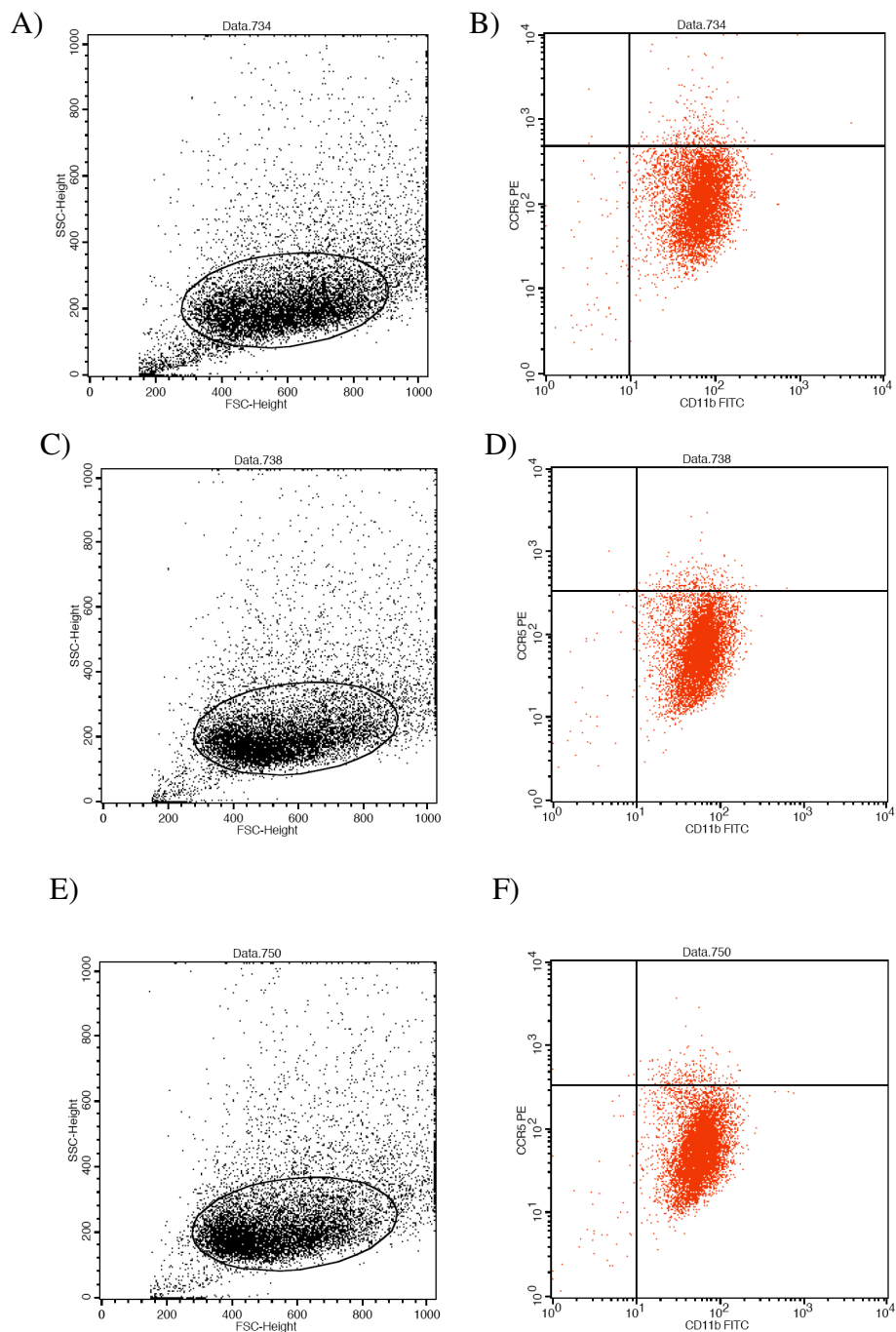
Por isso, nossos resultados mostram que os LPGs das duas espécies de *Leishmania*, podem ativar mecanismos diferentes em macrófagos intraperitoneais devido tanto ao grau de ativação das células quanto às variações estruturais da molécula. Estes dados nos levam a assumir que a presença de LPG pode alterar o perfil de ativação de macrófagos influenciando na resposta imune desenvolvida por estas células, podendo favorecer o processo de cura do parasitismo ou até reduzir mecanismos reguladores da resposta imune. Vários trabalhos e nossos dados demonstram que a diversidade da resposta imune desencadeada por parasitos do gênero *Leishmania* pode estar relacionada ao parasito, sendo a cura ou persistência do protozoário determinada por um conjunto complexo de fatores que não podem ser explicados separadamente.

O recrutamento de células para o sítio de infecção é essencial para o desenvolvimento da resposta imune celular do hospedeiro. Este processo é controlado por quimiocinas produzidas por leucócitos e células do tecido. A migração, a composição celular e a ativação das células no início da infecção podem definir o curso da doença (Teixeira e cols., 2006).



**Figura 6:** Gráficos gerados a partir de macrófagos intraperitoneais de C57BL/6 marcados com anticorpos fluorescentes após 48h de cultura estimulados ou não com IFN- $\gamma$  e LPS na ausência ou presença de 1, 5 ou 10 $\mu$ g/mL de LPG de *L. braziliensis* ou *L. amazonensis*. A, D e G) Plotagem de 10000 células em gráficos de tamanho X granulicidade; B, E e H) Plotagem da área demarcada em A, D e G com a marcação de CD11b e CD86; C, F e I) Plotagem da área demarcada em A, D e G com a marcação de CD11b e MHC II. A, B e C correspondem a macrófagos não ativados (controle negativo). D, E e F correspondem a macrófagos ativados com LPS+IFN- $\gamma$ . G, H e I correspondem a macrófagos ativados com LPS+IFN- $\gamma$  na presença de LPG de *L. amazonensis*. Os quadrantes foram divididos considerando as marcações de cada controle de isotipo para as células. Os dados e gráficos foram gerados em aparelho de FACS e com auxílio do programa CellQuest-BD. Os resultados correspondem a um experimento representativo de três.



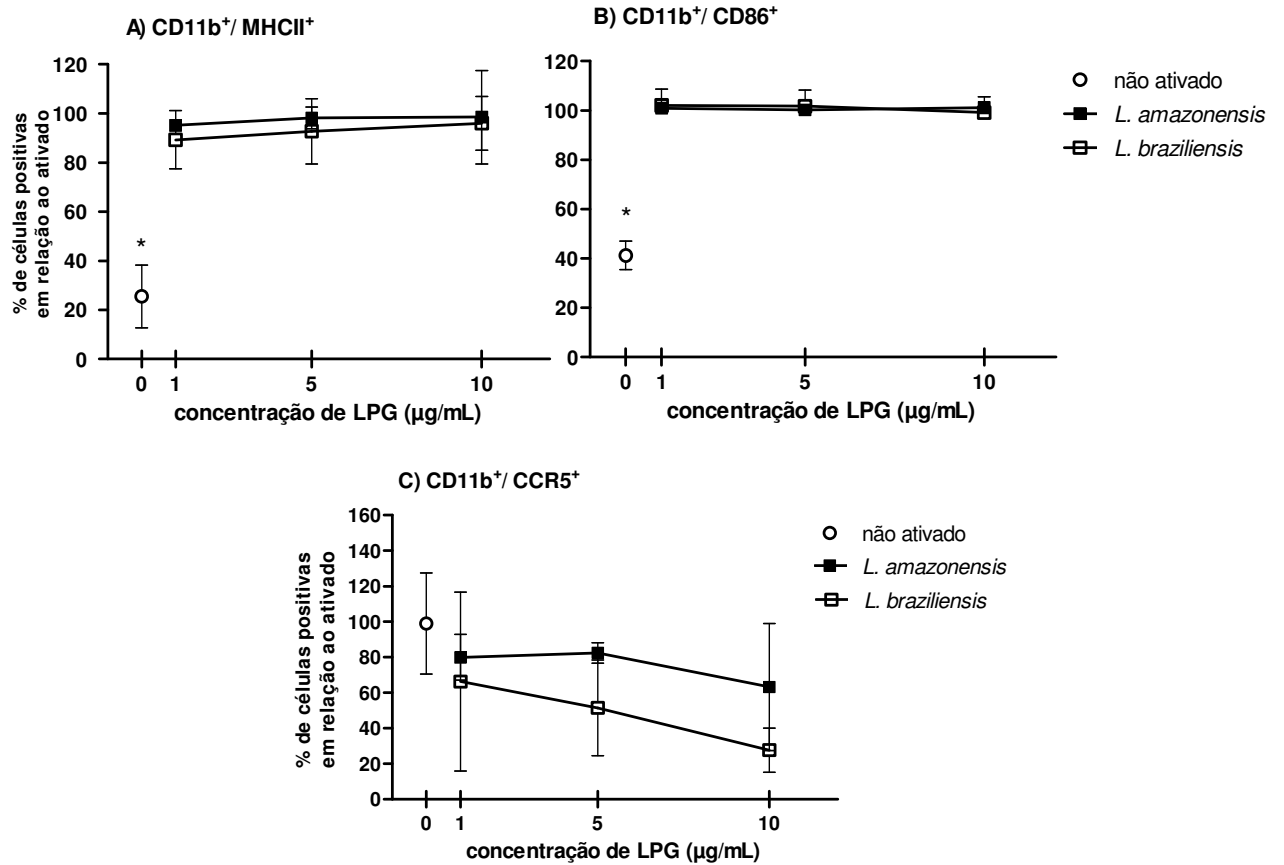


**Figura 7:** Gráficos gerados a partir de macrófagos intraperitoneais de C57BL/6 marcados com anticorpos fluorescentes após 48h de cultura estimulados ou não com IFN- $\gamma$  e LPS na ausência ou presença de 1, 5 ou 10 $\mu$ g/mL de LPG de *L. braziliensis* ou *L. amazonensis*. A, C e E) Plotagem de 10000 células em gráficos de tamanho X granulicidade. B, D e F) Plotagem da área demarcada em A, C e E com a marcação de CD11b e CCR5. A e B correspondem a macrófagos não ativados (controle negativo). C e D correspondem a macrófagos ativados com LPS+IFN- $\gamma$ . E e F correspondem a macrófagos ativados com LPS+IFN- $\gamma$  na presença de LPG de *L. amazonensis*. Os quadrantes foram divididos considerando as marcações de cada controle de isotipo para as células. Os dados e gráficos foram gerados em aparelho de FACS e com auxílio do programa CellQuest-BD. Os resultados correspondem a um experimento representativo de três.

Para análise mais detalhada do perfil de ativação, de maturação e receptores necessários a migração de macrófagos em presença do LPG, as células mantidas em cultura por 48h foram marcadas com anticorpos fluorescentes que reconhecem moléculas de superfície e receptores de quimiocinas envolvidos na resposta imune ao parasito, exemplificados na figuras 6 e 7.

A expressão de CD11b foi utilizada como marcador para macrófagos estando presente em 100% das células analisadas. As células marcadas foram lidas (10000 células por teste) e analisadas no programa CellQuest. Os dados foram plotados em gráficos de tamanho X granulosidade (FSC X SSC) onde foi marcada a população de células a ser analisada (R1) (figuras 6 e 7). A partir desta população foram gerados gráficos de intensidade de fluorescência de CD11b X demais marcações (MHC II, CD86 ou CCR5) (figuras 6- A; D; F e 7- A; C). Os quadrantes foram marcados de acordo com os controles de istipos utilizados para cada marcação. As porcentagens de células duplo-positivas foram relacionadas às porcentagens obtidas no controle ativado com LPS e IFN- $\gamma$  e foram plotadas em gráficos em função da concentração de LPG adicionado ao sistema. (figura 8).

Assim como relatado na literatura observamos que a presença de LPS e IFN- $\gamma$  promove a ativação de macrófagos intraperitoneais aumentando a produção de NO, a expressão de MHCII e CD86. Comparando as porcentagens de células duplo-positivas, CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>, verificamos que macrófagos ativados com LPS e IFN- $\gamma$  apresentam um aumento significativo na porcentagem de células positivas em relação às células controle (figuras 6- C; F e 8- A). Células não ativadas positivas para MHC II equivalem a 25% da porcentagem de células ativadas (figura 8- A). Observamos que algo semelhante ocorre quando comparamos a expressão de CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> (figuras 6- B; E e 8- B). A expressão de CD86 apresentada por macrófagos não ativados equivale a 41% do grupo ativado com LPS e IFN- $\gamma$  (figura 8- B). Porém a presença de LPG não é capaz de alterar os perfis de expressão tanto de MHC II quanto de CD86 em macrófagos ativados.



**Figura 8:** Efeito da adição de LPG sobre a expressão de MHCII, CD86 e CCR5 por macrófagos peritoneais ativados. Macrófagos intraperitoneais provenientes de camundongos C57BL/6 foram estimulados por 48h com 100pg/mL de LPS e 4U/mL de IFN- $\gamma$  (controle positivo) na presença ou ausência das concentrações indicadas de LPG de *L. amazonensis* (quadrado aberto) ou de *L. braziliensis* (quadrado fechado). O círculo aberto corresponde ao controle negativo, não ativado. A) porcentagem de células que expressam CD11b e MHC II em relação ao controle positivo. B) porcentagem de células que expressam CD11b e CD86 em relação ao controle positivo. C) porcentagem de células que expressam CD11b e CCR5 em relação ao controle positivo. A leitura foi realizada em aparelho de FACS. Dados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. \* representa diferença significativa em relação ao controle positivo  $p < 0,05$  – Teste t de student.

Além da porcentagem de células que expressam MHC II analisamos a expressão deste marcador em células com baixa, média e alta intensidade de expressão. A partir da região demarcada (R1) nos gráficos de tamanho x granulosidade (figura 9- A; D; G) foram gerados histogramas para marcação com CD11b e região positiva para o marcador (R2) foi demarcada (figura 9- B; E; H). As células pertencentes às duas regiões R1 e R2 foram plotadas em gráfico de expressão de CD86 x MHC II (figura 9- C; F; I).

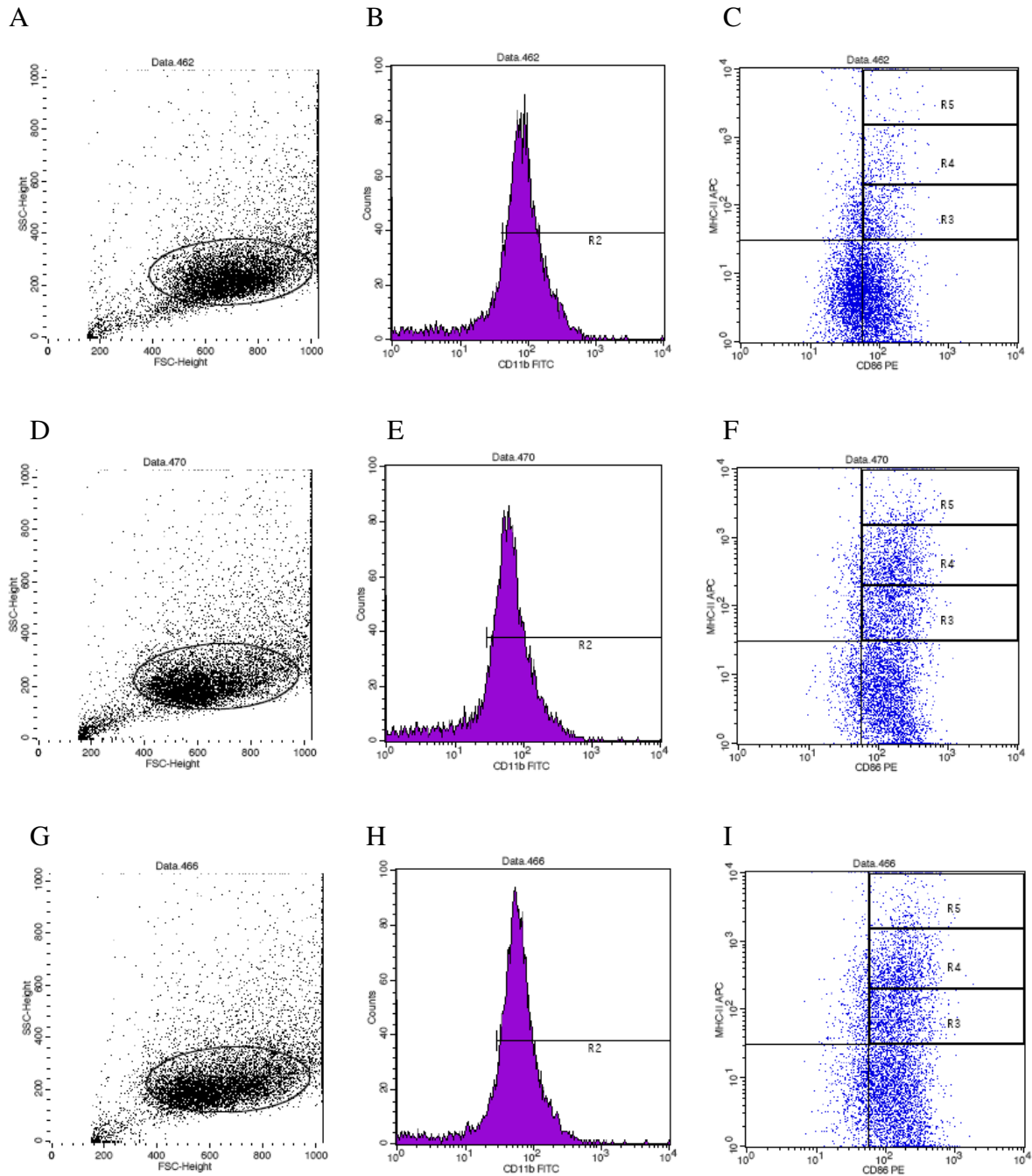
O quadrante positivo para as duas marcações foi dividido em 3 regiões que representam a intensidade de expressão do MHC II em células positivas para CD86 (R3- baixa expressão de MHC II; R4- média expressão de MHC II; R5- alta expressão de MHC II) e a porcentagem de células analisada.

A figura 9 exemplifica os dados equivalentes a um experimento de três estando representado em A, B e C os gráficos de macrófagos não ativados (controle negativo), em D, E e F os gráficos de macrófagos ativados (controle positivo) e em G, H e I gráficos que representam os grupos ativadas em presença do LPG. A partir das porcentagens de células positivas para cada região foram gerados gráficos de porcentagem em relação às células ativadas (figura 10).

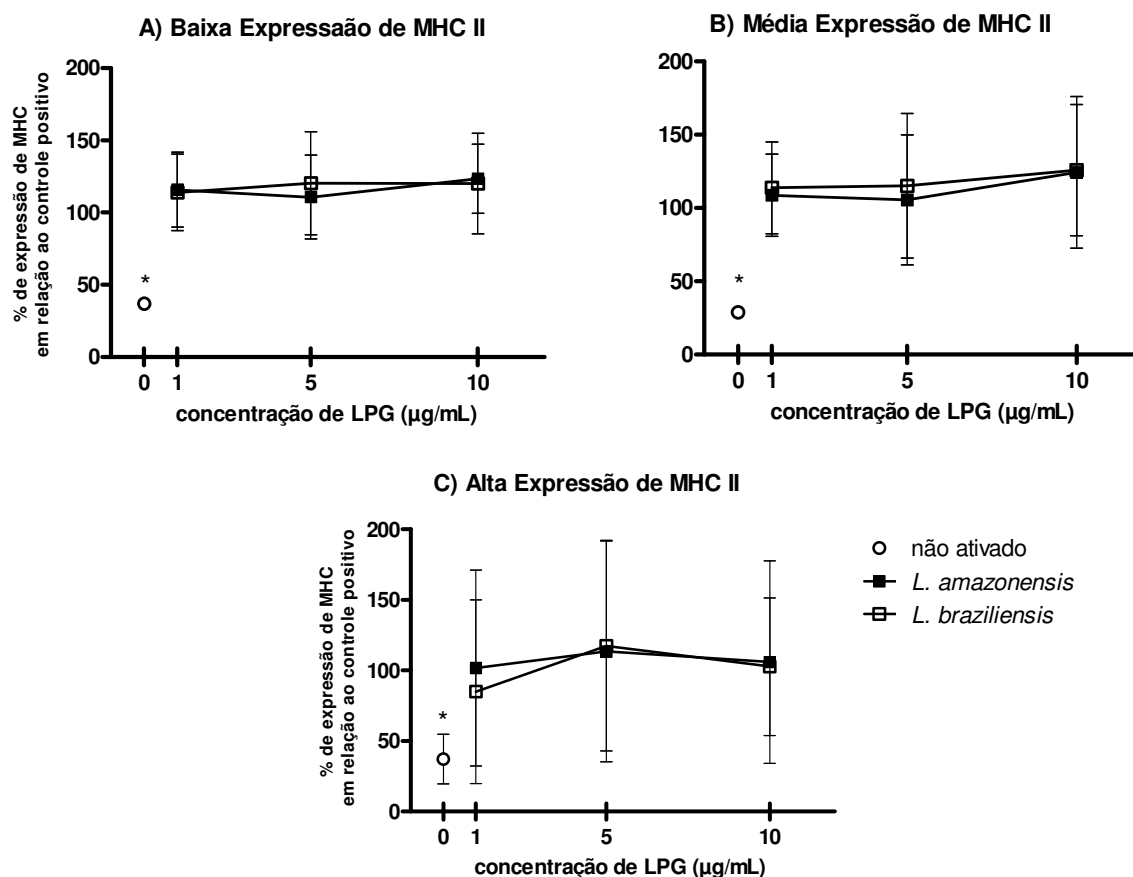
Tais dados revelaram aumento da porcentagem de células que expressam MHC II após ativação com LPS e IFN- $\gamma$ , tendo um aumento de aproximadamente 50% na porcentagem de células positivas (figura 10). Porém a adição do LPG ao sistema parece não modificar o perfil de células ativadas com baixa, média ou alta expressão de MHC II (figura 10- A; B; C).

Para as marcações com CD11b<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> observamos baixa porcentagem de positividade em todas as células analisadas não sendo verificadas diferenças entre o controle positivo e o controle negativo (figura 7 e 8- C). Apesar da baixa expressão de CCR5 encontrada e a variabilidade dos dados podemos observar que ativação ou a presença do LPG não alteraram o perfil de células positivas para o receptor (figura 8 – C).

Mesmo na avaliação dos perfis de intensidade de expressão de células duplo positivas para todas as marcações (CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> e CD11b<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>) não revelou diferenças significativas entre os grupos em presença ou ausência de LPG (dados não mostrados). A intensidade da expressão de MHC II, CD86 e CCR5 parece não ser alterada pela presença do LPG.



**Figura 9:** Gráficos gerados a partir de macrófagos intraperitoneais de C57BL/6 marcados com anticorpos fluorescentes após 48h de cultura estimulados ou não com IFN- $\gamma$  e LPS na ausência ou presença de 1, 5 ou 10 $\mu$ g/mL de LPG de *L. braziliensis* ou *L. amazonensis*. A, D e G) Plotagem de 1000 células em gráficos de tamanho X granulicidade; B, E e H) Histograma das células marcadas na área R1 em A, D e G que são CD11b<sup>+</sup>; C, F e I) Plotagem da área demarcada em A, D e G + R2 de B, E e H com a marcação de CD86 e MHC II. A, B e C correspondem a macrófagos não ativados (controle negativo). D, E e F correspondem a macrófagos ativados com LPS+IFN- $\gamma$ . G, H e I correspondem a macrófagos ativados com LPS+IFN- $\gamma$  na presença de LPG de *L. amazonensis*. Os quadrantes foram divididos considerando as marcações de cada controle de isotipo para as células. Os dados e gráficos foram gerados em aparelho de FACS e com auxílio do programa CellQuest-BD. Os resultados correspondem a um experimento representativo de três.



**Figura 10:** Efeito da adição de LPG sobre a expressão de MHCII em macrófagos peritoneais ativados. Macrófagos intraperitoneais provenientes de camundongos C57BL/6 foram estimulados por 48h com 100pg/mL de LPS e 4U/mL de IFN- $\gamma$  (controle positivo) na presença ou ausência das concentrações indicadas de LPG de *L. amazonensis* (quadrado aberto) ou de *L. braziliensis* (quadrado fechado). O círculo aberto corresponde ao controle negativo, não ativado. A) porcentagem de células positivas com baixa intensidade de MHC II (R3 na figura 11) em relação ao controle positivo. B) porcentagem de células positivas com média intensidade de MHC II (R4 na figura 11) em relação ao controle positivo. C) porcentagem de células positivas com alta intensidade de MHC II (R5 na figura 11) em relação ao controle positivo. A leitura foi realizada em aparelho de FACS. Dados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. \* representa diferença significativa em relação ao controle positivo  $p < 0,05$  – Teste t de student.

As moléculas de MHC II e CD86 estão envolvidas na ativação e apresentação de antígenos que são processos cruciais no desenvolvimento de resposta imune eficaz contra o parasito. A apresentação de antígeno via MHC II com co-estimulação de CD86 resulta no reconhecimento/ativação de linfócitos T e um aumento da atividade microbicida de macrófagos (Gregory & Olivier, 2005b). Apesar disto, MHC II não é essencial para eliminação da *Leishmania* e cura completa do parasitismo (Reiner e cols., 1993).

A própria presença do parasito muitas vezes induz vias de escape na defesa do hospedeiro. Trabalhos mostram que a presença de *L donovani* inibe a expressão de MHC I e II, em contraste, *L amazonensis* parece não alterar o perfil de expressão destas moléculas (Lang e cols., 1994; Reiner e cols., 1987). O efeito do LPG de *L. major* sobre MHC II e CD86 foi descrito por Ponte-Source (2001) em Células de Langerhans de camundongos Balb/c, onde o glicolípide não foi capaz de alterar o perfil de expressão, porém diminui a capacidade migratória desta célula, do tecido para o linfonodo, com a alteração de moléculas de adesão. Nossos dados revelam que a ativação dos macrófagos com LPS e IFN- $\gamma$  foi eficaz, sendo capaz de aumentar a expressão de MHC II e CD86. Porém, não observamos modificações significativas quando adicionamos LPG tanto de *L. braziliensis* quanto de *L. amazonensis*.

A interação da molécula de CD86 com seu receptor durante apresentação de antígenos é de grande importância e ocorre de maneira concomitante à interação de MHC II/antígeno ao receptor de células T (TCR) promovendo ativações eficientes da resposta imune específica. A deficiência deste processo em células responsáveis pela resposta imunológica contribui para patogenicidade em infecções por *L. amazonensis* (Ji e cols., 2003). Além disto, CD86 pode interagir com a proteína CTLA-4 promovendo processos de anergia em linfócitos T, estando envolvida na regulação da resposta imune. Em *Leishmania* CD86 foi descrita como sendo crucial para diferenciação de células do tipo Th2 em camundongos susceptíveis a infecção por *L. major* (Brown e cols., 1996), propiciando o estabelecimento do parasito.

Sabemos que receptores do tipo CCR5 tem papel fundamental na migração de monócitos para o tecido (Teixeira e cols., 2006) estando envolvidos em um mecanismo importante para resposta imune ao parasito. Trabalhos mostram que camundongos

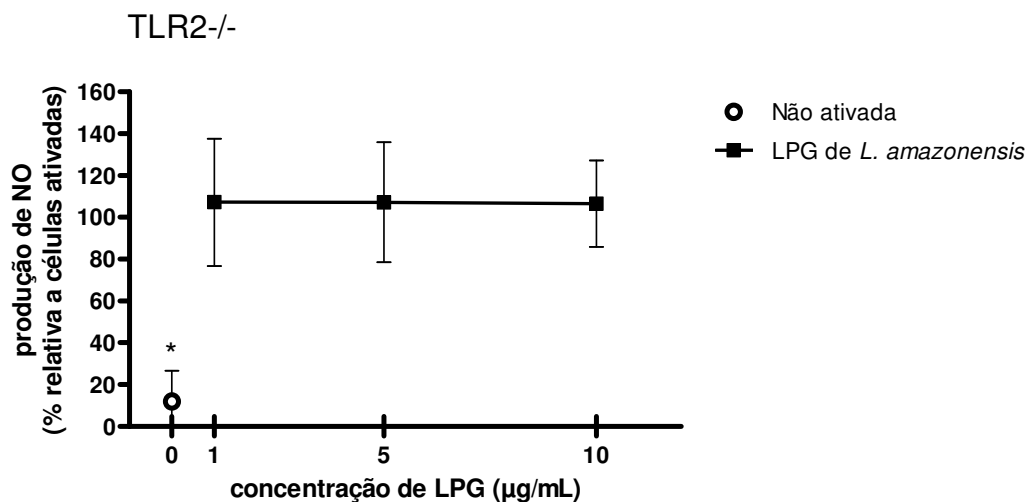
infectados com *L. amazonensis* quando comparados a camundongos infectados com *L. major* diminuem, nos primeiros estágios de infecção, a expressão de quimiocinas como MIP-2, MIP-1 $\alpha$ , CCL5 e receptores como CCR1, CCR2 e CCR5 (Ji e cols., 2003). Porém nossos resultados demonstram que o LPG tanto de *L. braziliensis* quanto de *L. amazonensis* não tem efeito sobre a expressão do receptor CCR5 em macrófagos. Lo e colaboradores (1998) descreveu o efeito do LPG de *L. donovani* em células do endotélio alterando a expressão de moléculas de adesão e de migração transendotelial, mas não observou as mesmas modificações em macrófagos.

A ativação de células da imunidade inata pode ocorrer com interações diretas do parasito com receptores de superfície destas células ou através de citocinas produzidas por células da imunidade adaptativa mais tardiamente ao processo inflamatório. A resposta imune inata é crucial para o desenvolvimento de uma resposta específica eficiente, e receptores do tipo Toll (TLRs) estão envolvidos na ativação de células dendríticas e macrófagos que são as principais células envolvidas na resposta inicial ao patógeno (Akira e cols., 2003).

TLRs são capazes de reconhecer sítios moleculares conservados provenientes de microrganismos que são ausentes em vertebrados. A ligação a alguns destes receptores é capaz de ativar cascatas que culminam com produção de citocinas inflamatórias necessárias para eliminação de parasitos como a *Leishmania*. Os TLRs podem ser agrupados segundo o tipo de molécula que podem reconhecer. Os lípides em geral podem ser reconhecidos por TLR 1, 2, 4 e 6. Vários trabalhos mostram que TLR 2 formam heterodímeros com TLR 1 e 6 e são capazes de reconhecer peptídeoglicanos, lipoproteínas, lipopeptídeos e âncoras de glicosilfosfatidilinositol (Akira, 2006).

Na tentativa de elucidar o papel do LPG de *Leishmania amazonensis* e sua interação com TLR2, avaliamos o perfil de ativação de macrófagos intraperitoneais de camundongos TLR2<sup>-/-</sup> submetidos à presença de IFN- $\gamma$ , LPS e LPG purificado da espécie de *L. amazonensis* (figura 11) quanto a produção de NO e IL-10 “*in vitro*”.





**Figura 11:** Efeito da adição de LPG sobre a expressão de NO por macrófagos peritoneais ativados. Macrófagos intraperitoneais provenientes de camundongos TLR2<sup>-/-</sup> foram estimulados por 48h com 100pg/mL de LPS e 4U/mL de IFN- $\gamma$  (controle positivo) na presença ou ausência das concentrações indicadas de LPG de *L. amazonensis* (quadrado aberto). O círculo aberto corresponde ao controle negativo, não ativado. As dosagens foram realizadas pelo método de Greiss. Dados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. \* representa diferença significativa em relação ao controle positivo  $p < 0,05$  – Teste t de student.

Observamos que tais células produzem níveis menores (valores absolutos não mostrados nos gráficos) de NO ( $32,72 \text{ M} \pm 7,75$ ) quando comparadas a células de B6 ativadas ( $52,64 \text{ M} \pm 7,01$ ).

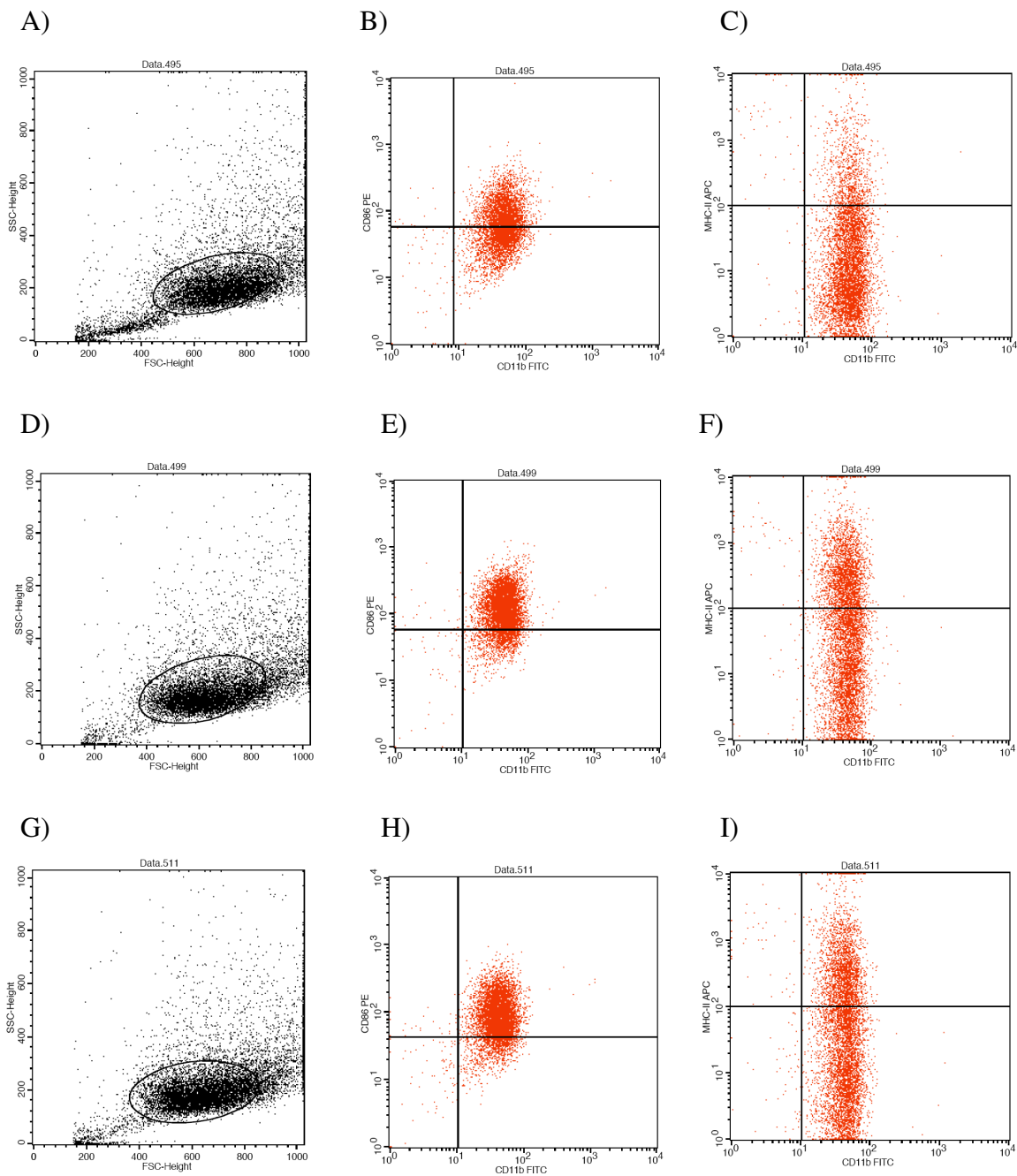
Quando analisamos a porcentagem de produção de NO do controle negativo em relação ao controle ativado verificamos que a produção aumenta significativamente (figura 11). Porém, a presença de LPG de *L. amazonensis* não modifica o perfil de ativação de macrófagos intraperitoneais de camundongos TLR2<sup>-/-</sup> (figura 11) semelhante ao encontrado para camundongos C57BL/6 (figura 5- A). Para as células intraperitoneais provenientes de camundongos TLR2<sup>-/-</sup> não detectamos a presença da citocina IL-10 no sobrenadante de cultura com 48h.

Além das dosagens de NO e IL-10 realizamos dosagens da citocina IL-12 não sendo detectada em sobrenadantes de cultura de macrófagos intraperitoneais ativadas tanto de C57BL/6 quanto de TLR2<sup>-/-</sup>.

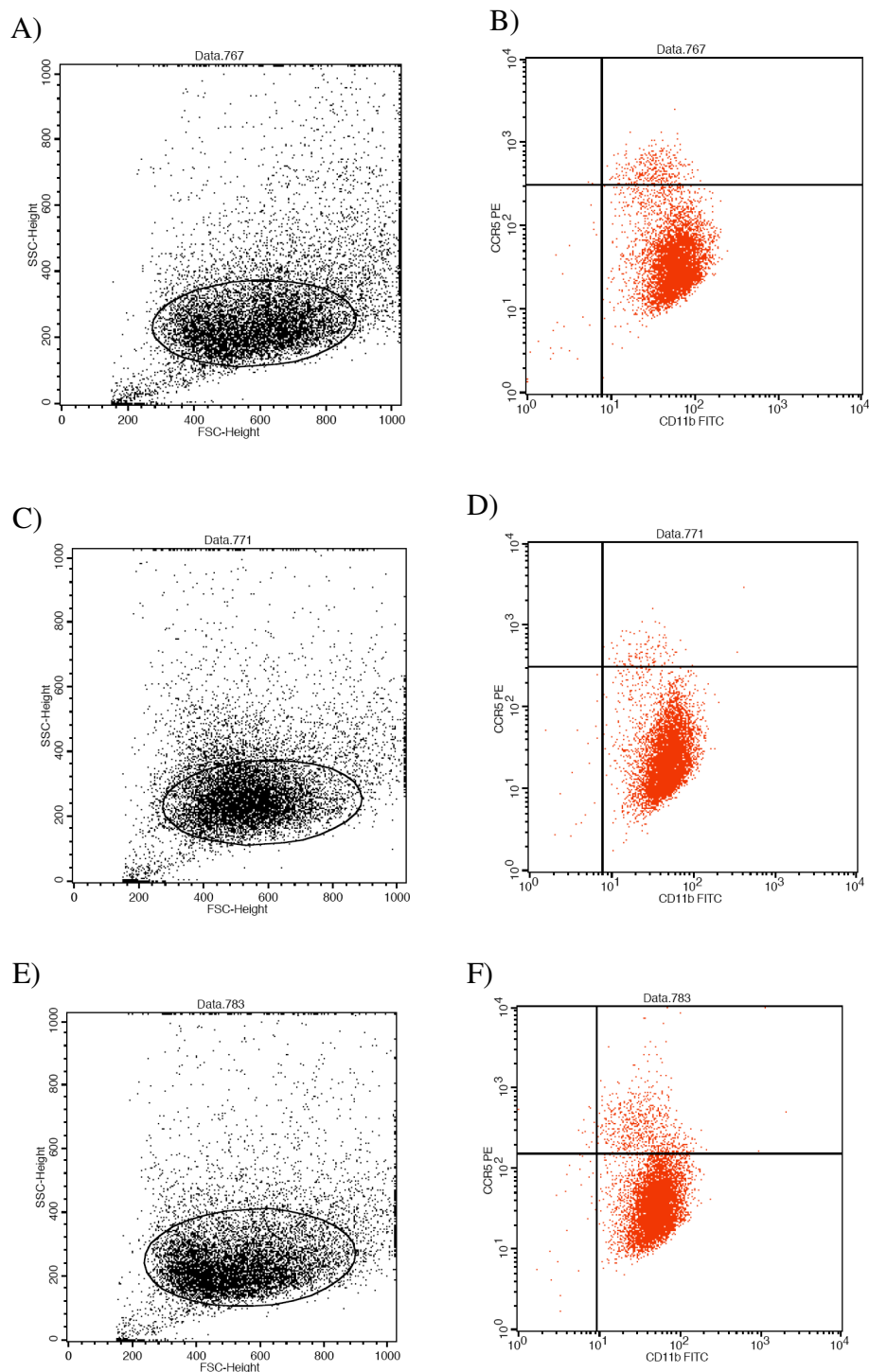
Trabalhos relatam que TL4 e TLR2 induzem sinergicamente a produção da citocina antiinflamatória IL-10 em CDs, além da presença de IFN- $\gamma$  suprimir a produção de IL-10 via TLR2 em macrófagos (Hirata e cols., 2008; Hu e cols., 2007; Hu e cols., 2006).

Contudo, especulamos que a ausência de TLR2 altera o perfil de produção de IL-10 das células a níveis não detectáveis pela metodologia que utilizamos. Isto fez com que não fossemos capazes de avaliar a influência destes receptores nas alterações provocadas pelo LPG de *L. amazonensis* em macrófagos ativados.

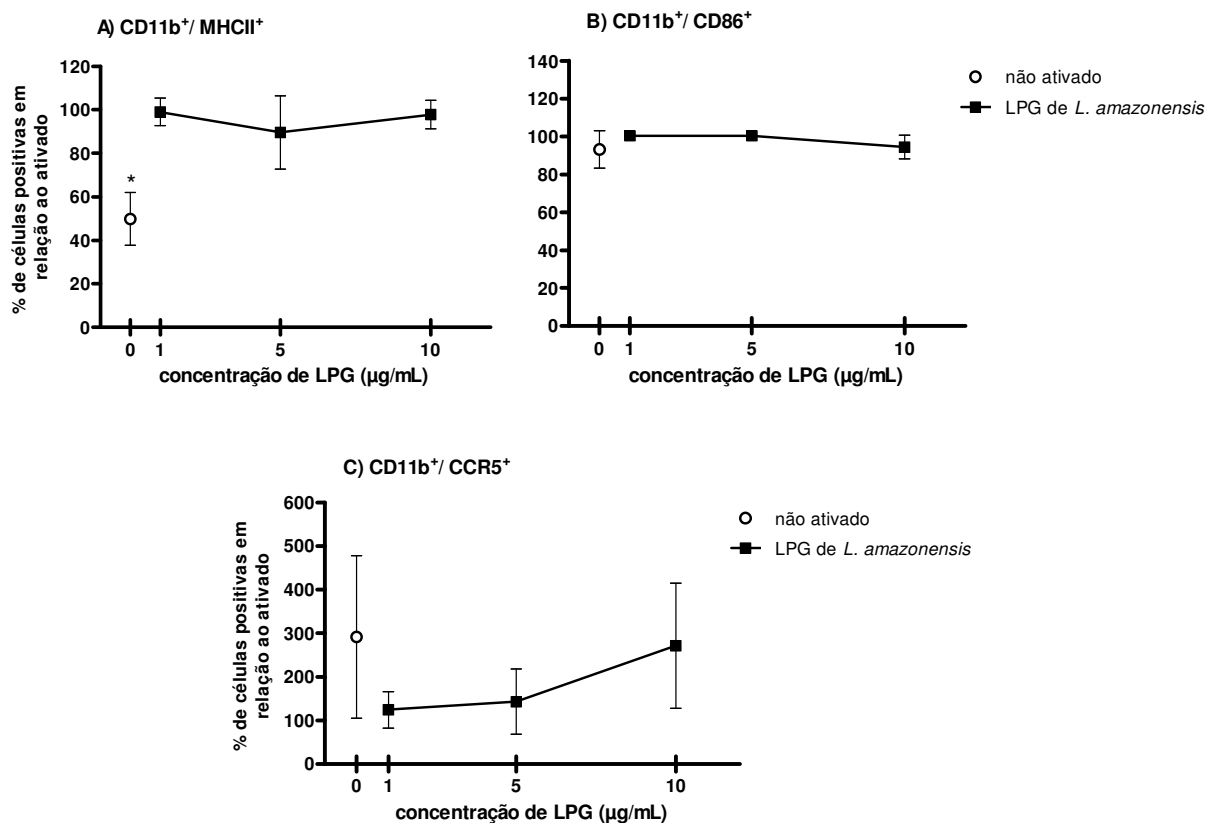
Também foram realizadas a análise do perfil de ativação, maturação e migração de macrófagos em presença do LPG de células provenientes de camundongos TLR2<sup>-/-</sup> exemplificado nas figuras 12, 13 e 14. Para as células de camundongos TLR2<sup>-/-</sup> foi utilizada mesma metodologia de análise e plotagem dos dados que a utilizada para os macrófagos de C57BL/6.



**Figura 12:** Gráficos gerados a partir de macrófagos intraperitoneais de TLR2<sup>-/-</sup> marcados com anticorpos fluorescentes após 48h de cultura estimulados ou não com IFN- $\gamma$  e LPS na ausência ou presença de 1, 5 ou 10 $\mu$ g/mL de LPG de *L. amazonensis*. A, D e G) Plotagem de 1000 células em gráficos de tamanho X granulosidade; B, E e H) Plotagem da área demarcada em A, D e G com a marcação de CD11b e CD86; C, F e I) Plotagem da área demarcada em A, D e G com a marcação de CD11b e MHC II. A, B e C correspondem a macrófagos não ativados (controle negativo). D, E e F correspondem a macrófagos ativados com LPS+IFN- $\gamma$ . G, H e I correspondem a macrófagos ativados com LPS+IFN- $\gamma$  na presença de LPG de *L. amazonensis*. Os quadrantes foram divididos considerando as marcações de cada controle de isotipo para as células. Os dados e gráficos foram gerados em aparelho de FACS e com auxílio do programa CellQuest-BD. Os resultados correspondem a um experimento representativo de três.



**Figura 13:** Gráficos gerados a partir de macrófagos intraperitoneais de TLR2<sup>-/-</sup> marcados com anticorpos fluorescentes após 48h de cultura estimulados ou não com IFN- $\gamma$  e LPS na ausência ou presença de 1, 5 ou 10 $\mu$ g/mL de LPG de *L. amazonensis*. A, C e E) Plotagem de 1000 células em gráficos de tamanho X granulocidade; B e D) Plotagem da área demarcada em A, C e E com a marcação de CD11b e CCR. A e B correspondem a macrófagos não ativados (controle negativo). C e D correspondem a macrófagos ativados com LPS+IFN- $\gamma$ . E e F correspondem a macrófagos ativados com LPS+IFN- $\gamma$  na presença de LPG de *L. amazonensis*. Os quadrantes foram divididos considerando as marcações de cada controle de isotipo para as células. Os dados e gráficos foram gerados em aparelho de FACS e com auxílio do programa CellQuest-BD. Os resultados correspondem a um experimento representativo de três.



**Figura 14:** Efeito da adição de LPG sobre a expressão de MHCII, CD86 e CCR5 por macrófagos peritoneais ativados. Macrófagos intraperitoneais provenientes de camundongos TLR2<sup>-/-</sup> foram estimulados por 48h com 100pg/mL de LPS e 4U/mL de IFN- $\gamma$  (controle positivo) na presença ou ausência das concentrações indicadas de LPG de *L. amazonensis* (quadrado aberto). O círculo aberto corresponde ao controle negativo, não ativado. A) porcentagem de células que expressam CD11b e MHC II em relação ao controle positivo. B) porcentagem de células que expressam CD11b e CD86 em relação ao controle positivo. C) porcentagem de células que expressam CD11b e CCR5 em relação ao controle positivo. A leitura foi realizada em aparelho de FACS. Dados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. \* representa diferença significativa em relação ao controle positivo  $p < 0,05$  – Teste t de student.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados anteriormente na avaliação de células provenientes de C57BL/6. As porcentagens de células duplo-positivas para CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> apresentam um aumento de 50% em macrófagos ativados com LPS e IFN- $\gamma$  em relação às células controle negativo (figuras 12 e 14-A). Porém, em contraste com outros resultados verificamos que a porcentagem de células CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> não apresentou alterações após ativação (figuras 12 e 14-B). Este fato pode estar relacionado a ausência de TLR2 e a ativação com LPS. Hirata e colaboradores (2008) descrevem que

ligantes de TLR2 induzem o aumento de expressão de CD86 em células dendríticas.

Verificamos que a ativação promovida por LPS e IFN- $\gamma$  na ausência de TLR2 não ocorre de maneira eficaz demonstrando a importância deste receptor para a resposta imune a ser desenvolvida.

Apesar destes resultados o LPG de *L. amazonensis* não foi capaz de alterar os perfis de expressão tanto de MHC II quanto de CD86 na superfície de macrófagos ativados assim como em camundongos C57BL/6.

Para as marcações com CD11b<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> (figuras 13 e 14- C) observamos baixa porcentagem de positividade em todas as células analisadas e alta variabilidade dos dados não sendo verificadas diferenças entre o controle positivo e o controle negativo. Assim como nos dados anteriores a presença do LPG não altera o perfil de células positivas para o receptor (figura 14- C).

Diversos trabalhos vêm mostrando o papel de TLR2 na interação do LPG de *Leishmania* com células da imunidade inata. A interação de TLR2 com LPG foi descrita como ativadora do fator transcricional NF- $\kappa$ B promovendo a síntese de citocinas inflamatórias que estão diretamente relacionadas a eliminação do parasito. Além disto, células provenientes de camundongos C57BL/6 têm como principal via de reconhecimento de LPG e GIPLs em *L. major* a interação de TLR2 e a molécula adaptadora MyD88, porém, tal ativação não ocorre via TLR4 (de Veer e cols., 2003). Becker e colaboradores (2003) mostraram que LPG de *Leishmania major* interage com TLR2 em células NK e pode ser um importante ativador da resposta imune ao parasito aumentando a produção de IFN- $\gamma$ , TNF e a transcrição de genes relacionados ao NF- $\kappa$ B. No entanto, alguns glicolípides parecem não estar relacionados a ativação via TLR2. Em trabalho recente PPG de amastigota em *L. pifanoi* induz produção de citocinas inflamatórias via TLR4 (Whitaker e cols., 2008). Por isso, estudos que avaliam a interação do LPG com TLRs são espécie específicos, assim como, a estrutura destes glicolípides.

Todas as funções atribuídas ao LPG fazem da molécula um importante objeto de estudo para compreensão da modulação da resposta imune celular. Nossos resultados confirmam que o LPG de *Leishmania* por ser uma molécula estruturalmente variável pode induzir diferentes respostas imunes em camundongos, bem como diferentes interações parasito-hospedeiro que podem levar ao esclarecimento de aspectos ligados a patologia da

doença e suas manifestações clínicas. Porém a cura ou persistência do protozoário são determinadas por um conjunto complexo de fatores que envolvem diversas interações e características que não podem ser atribuídas a uma única molécula. Além disso, a resposta imune é determinada não só por estas interações, mas também pela genética e estado nutricional do hospedeiro.

Apesar da grande variação demonstrada, acreditamos que nossos dados nos permitem auxiliar no entendimento do curso da infecção e nos padrões determinados pela presença do LPG em parasitos de espécies de *Leishmania* importantes para a região em que vivemos.

## ***4. Conclusões***



## 5. CONCLUSÕES

As moléculas de LPGs presentes na superfície das espécies de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* apresentaram diversidades estruturais e/ou quantitativas na proporção de resíduos de galactose/manose ou de outros açúcares presentes que podem evidenciar a variabilidade estrutural ou a variabilidade na expressão do LPG de superfície.

Os LPGs das duas espécies de *Leishmania* estudadas quando administrados em conjunto com os parasitos de *L. braziliensis* durante a infecção em camundongos C57BL/6 não foram capazes de alterar o perfil de lesão provocado pelo protozoário. No entanto células do baço e linfonodo de camundongos infectados com *L. braziliensis* e LPG produzem níveis detectáveis da citocina IL-10 relacionada aos mecanismos de regulação da resposta imune.

Os LPGs purificados não foram capazes de ativar macrófagos intraperitoneais, porém, quando adicionados a cultura juntamente com LPS e IFN- $\gamma$  foram capazes de alterar o perfil de ativação. O LPG de *L. braziliensis* pode induzir a queda da produção de NO por macrófagos ativados de maneira dose dependente. No entanto, apesar do LPG de *L. amazonensis* não ser capaz de alterar a produção de NO pode diminuir a produção de IL-10 por estas células. Isto demonstra que o LPG de *L. braziliensis* possui efeito direto sobre a eliminação do parasito, o que parece não ocorrer em presença do LPG de *L. amazonensis*.

Porém os LPGs estudados não foram capazes de modificar o perfil de expressão de moléculas relacionadas a apresentação, ativação e migração celular expressas na superfície de macrófagos como MHC II, CD86 e CCR5.

Através de nossos resultados não podemos concluir que TLR2 está envolvido nas alterações imunológicas provocadas pela presença do LPG de *L. amazonensis* em macrófagos intraperitoneais ativados devido a deficiência do camundongo mutado na produção de IL-10.

Entretanto podemos evidenciar que a presença do LPG tanto de *L. braziliensis* quanto de *L. amazonensis* durante a ativação de macrófagos peritoneais de C57BL/6 podem direcionar a resposta imune do parasito, sendo capaz de atuar em diferentes mecanismos na ativação da célula devido a variabilidade da molécula.

## ***5. Referências Bibliográficas***

**6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** Referências Bibliográficas

- AKIRA S. (2006) TLR signaling. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **311**, 1-16.
- AKIRA S., YAMAMOTO M. & TAKEDA K. (2003) Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem.Soc.Trans.* **31**, 637-642.
- ANSTEAD G.M., CHANDRASEKAR B., ZHAO W., YANG J., PEREZ L.E. & MELBY P.C. (2001) Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection  
1. *Infect.Immun.* **69**, 4709-4718.
- ASHFORD R.W. (2000) The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int.J.Parasitol.* **30**, 1269-1281.
- BARRAL A., PEDRAL-SAMPAIO D., GRIMALDI J.G., MOMEN H., MCMAHON-PRATT D., RIBEIRO d.J., ALMEIDA R., BADARO R., BARRAL-NETTO M., CARVALHO E.M. & . (1991) Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease  
1. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **44**, 536-546.
- BARRAL-NETTO M., BARRAL A., BROWNELL C.E., SKEIKY Y.A., ELLINGSWORTH L.R., TWARDZIK D.R. & REED S.G. (1992) Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science* **257**, 545-548.
- BECKER I., SALAIZA N., AGUIRRE M., DELGADO J., CARRILLO-CARRASCO N., KOBEH L.G., RUIZ A., CERVANTES R., TORRES A.P., CABRERA N., GONZALEZ A., MALDONADO C. & ISIBASI A. (2003) *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2  
1. *Mol.Biochem.Parasitol.* **130**, 65-74.
- BRITTINGHAM A. & MOSSER D.M. (1996) Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol.Today* **12**, 444-447.
- BROWN J.A., TITUS R.G., NABAVI N. & GLIMCHER L.H. (1996) Blockade of CD86 ameliorates *Leishmania major* infection by down-regulating the Th2 response. *J.Infect.Dis.* **174**, 1303-1308.
- BUTCHER B.A., TURCO S.J., HILTY B.A., PIMENTA P.F., PANUNZIO M. & SACKS D.L. (1996) Deficiency in beta1,3-galactosyltransferase of a *Leishmania major* lipophosphoglycan mutant adversely influences the *Leishmania*-sand fly interaction. *J.Biol.Chem.* **271**, 20573-20579.
- CASTRO-SOUSA F., PARANHOS-SILVA M., SHERLOCK I., PAIXAO M.S., PONTES-DE-CARVALHO L.C. & DOS-SANTOS W.L. (2001) Dissociation

- between vasodilation and Leishmania infection-enhancing effects of sand fly saliva and maxadilan. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **96**, 997-999.
- CHARMOY M., MEGNEKOU R., ALLENBACH C., ZWEIFEL C., PEREZ C., MONNAT K., BRETON M., RONET C., LAUNOIS P. & TACCHINI-COTTIER F. (2007) Leishmania major induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *J.Leukoc.Biol.* **82**, 288-299.
- CONVIT J., PINARDI M.E. & RONDON A.J. (1972) Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host  
1. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **66**, 603-610.
- CUPOLILLO E., MEDINA-ACOSTA E., NOYES H., MOMEN H. & GRIMALDI G., Jr. (2000) A revised classification for Leishmania and Endotrypanum  
3. *Parasitol.Today* **16**, 142-144.
- DE VEER M.J., CURTIS J.M., BALDWIN T.M., DIDONATO J.A., SEXTON A., MCCONVILLE M.J., HANDMAN E. & SCHOFIELD L. (2003) MyD88 is essential for clearance of Leishmania major: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur.J.Immunol.* **33**, 2822-2831.
- DESCOTEAUX A. & TURCO S.J. (1999) Glycoconjugates in Leishmania infectivity  
1. *Biochim.Biophys.Acta* **1455**, 341-352.
- DESCOTEAUX A. & TURCO S.J. (2002) Functional aspects of the Leishmania donovani lipophosphoglycan during macrophage infection  
1. *Microbes.Infect.* **4**, 975-981.
- DESJARDINS M. & DESCOTEAUX A. (1997) Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan. *J.Exp.Med.* **185**, 2061-2068.
- DUBOIS M., GRILLS K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. & SMITH F. (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350-353.
- FERGUSON M.A. (1997) The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **352**, 1295-1302.
- GREEN L.C., WAGNER D.A., GLOGOWSKI J., SKIPPER P.L., WISHNOK J.S. & TANNENBAUM S.R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal.Biochem.* **126**, 131-138.
- GREGORY D.J. & OLIVIER M. (2005b) Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite Leishmania. *Parasitology* **130 Suppl**, S27-S35
- GREGORY D.J. & OLIVIER M. (2005a) Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite Leishmania. *Parasitology* **130 Suppl**, S27-S35

- GRIMALDI G., Jr. & TESH R.B. (1993) Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research  
1. *Clin.Microbiol.Rev.* **6**, 230-250.
- GUHA-NIYOGI A., SULLIVAN D.R. & TURCO S.J. (2001) Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. *Glycobiology* **11**, 45R-59R.
- HANDMAN E. & BULLEN D.V. (2002) Interaction of Leishmania with the host macrophage. *Trends Parasitol.* **18**, 332-334.
- HILLEY J.D., ZAWADZKI J.L., MCCONVILLE M.J., COOMBS G.H. & MOTTRAM J.C. (2000) Leishmania mexicana mutants lacking glycosylphosphatidylinositol (GPI):protein transamidase provide insights into the biosynthesis and functions of GPI-anchored proteins. *Mol.Biol.Cell* **11**, 1183-1195.
- HIRATA N., YANAGAWA Y., EBIHARA T., SEYA T., UEMATSU S., AKIRA S., HAYASHI F., IWABUCHI K. & ONOE K. (2008) Selective synergy in anti-inflammatory cytokine production upon cooperated signaling via TLR4 and TLR2 in murine conventional dendritic cells. *Mol.Immunol.* **45**, 2734-2742.
- HU X., CHEN J., WANG L. & IVASHKIV L.B. (2007) Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *J.Leukoc.Biol.* **82**, 237-243.
- HU X., PAIK P.K., CHEN J., YARILINA A., KOCKERITZ L., LU T.T., WOODGETT J.R. & IVASHKIV L.B. (2006) IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity.* **24**, 563-574.
- ILG T. (2000) Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by Leishmania mexicana. *EMBO J.* **19**, 1953-1962.
- ILG T. (2001) Lipophosphoglycan of the protozoan parasite Leishmania: stage- and species-specific importance for colonization of the sandfly vector, transmission and virulence to mammals. *Med.Microbiol.Immunol.* **190**, 13-17.
- ILG T., ETGES R., OVERATH P., MCCONVILLE M.J., THOMAS-OATES J., THOMAS J., HOMANS S.W. & FERGUSON M.A. (1992) Structure of Leishmania mexicana lipophosphoglycan. *J.Biol.Chem.* **267**, 6834-6840.
- JII J., MASTERSON J., SUN J. & SOONG L. (2005) CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during Leishmania amazonensis infection  
1. *J.Immunol.* **174**, 7147-7153.
- JII J., SUN J. & SOONG L. (2003) Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with Leishmania amazonensis. *Infect.Immun.* **71**, 4278-4288.

- JONES D.E., ACKERMANN M.R., WILLE U., HUNTER C.A. & SCOTT P. (2002) Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infect.Immun.* **70**, 2151-2158.
- KANE M.M. & MOSSER D.M. (2001) The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis  
1. *J.Immunol.* **166**, 1141-1147.
- KAVOOSI G., ARDESTANI S.K., KARIMINIA A., ABOLHASSANI M. & TURCO S.J. (2006) *Leishmania major*: Reactive oxygen species and interferon gamma induction by soluble lipophosphoglycan of stationary phase promastigotes. *Exp.Parasitol.* **114**, 323-328.
- LAINSON R. & SHAW J.J. (1978) Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature* **273**, 595-600.
- LANG T., DE CHASTELLIER C., FREHEL C., HELLIO R., METEZEAU P., LEO S.S. & ANTOINE J.C. (1994) Distribution of MHC class I and of MHC class II molecules in macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J.Cell Sci.* **107** (Pt 1), 69-82.
- LATTIME E.C., STOPPACCIARO A. & STUTMAN O. (1988) Limiting dilution analysis of TNF producing cells in C3H/HeJ mice. *J.Immunol.* **141**, 3422-3428.
- LIEW F.Y., MILLOTT S., PARKINSON C., PALMER R.M. & MONCADA S. (1990) Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J.Immunol.* **144**, 4794-4797.
- LO S.K., BOVIS L., MATURA R., ZHU B., HE S., LUM H., TURCO S.J. & HO J.L. (1998) *Leishmania* lipophosphoglycan reduces monocyte transendothelial migration: modulation of cell adhesion molecules, intercellular junctional proteins, and chemoattractants. *J.Immunol.* **160**, 1857-1865.
- LODGE R., DIALLO T.O. & DESCOTEAUX A. (2006) *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell Microbiol.* **8**, 1922-1931.
- LOVELACE J.K., DWYER D.M. & GOTTLIEB M. (1986) Purification and characterization of the extracellular acid phosphatase of *Leishmania donovani*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **20**, 243-251.
- LOVELACE J.K. & GOTTLIEB M. (1986) Comparison of extracellular acid phosphatases from various isolates of *Leishmania*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **35**, 1121-1128.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. & RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* **193**, 265-275.

- MAIOLI T.U., TAKANE E., ARANTES R.M., FIETTO J.L. & AFONSO L.C. (2004) Immune response induced by New World Leishmania species in C57BL/6 mice. *Parasitol.Res.* **94**, 207-212.
- MCCONVILLE M.J. & BACIC A. (1990) The glycoinositolphospholipid profiles of two Leishmania major strains that differ in lipophosphoglycan expression. *Mol.Biochem.Parasitol.* **38**, 57-67.
- MCCONVILLE M.J. & BLACKWELL J.M. (1991) Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of Leishmania donovani. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids  
4. *J.Biol.Chem.* **266**, 15170-15179.
- MCCONVILLE M.J., THOMAS-OATES J.E., FERGUSON M.A. & HOMANS S.W. (1990) Structure of the lipophosphoglycan from Leishmania major. *J.Biol.Chem.* **265**, 19611-19623.
- MENSA-WILMOT K., GARG N., MCGWIRE B.S., LU H.G., ZHONG L., ARMAH D.A., LEBOWITZ J.H. & CHANG K.P. (1999) Roles of free GPIs in amastigotes of Leishmania. *Mol.Biochem.Parasitol.* **99**, 103-116.
- MILON G., DEL GIUDICE G. & LOUIS J.A. (1995) Immunobiology of experimental cutaneous leishmaniasis  
4. *Parasitol.Today* **11**, 244-247.
- MOSMANN T.R. & COFFMAN R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties  
8. *Annu.Rev.Immunol.* **7**, 145-173.
- MUSKUS C., SEGURA I., ODDONE R., TURCO S.J., LEIBY D.A., TORO L., ROBLEDO S. & SARAVIA N.G. (1997) Carbohydrate and LPG expression in Leishmania viannia subgenus  
1. *J.Parasitol.* **83**, 671-678.
- ORLANDI P.A., Jr. & TURCO S.J. (1987) Structure of the lipid moiety of the Leishmania donovani lipophosphoglycan. *J.Biol.Chem.* **262**, 10384-10391.
- OUMEISH O.Y. (1999) Cutaneous leishmaniasis: a historical perspective. *Clin.Dermatol.* **17**, 249-254.
- PASARE C. & MEDZHITOV R. (2004) Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation  
1. *Immunity.* **21**, 733-741.
- PIANI A., ILG T., ELEFANTY A.G., CURTIS J. & HANDMAN E. (1999) Leishmania major proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function. *Microbes.Infect.* **1**, 589-599.

- PIMENTA P.F., SARAIVA E.M., ROWTON E., MODI G.B., GARRAWAY L.A., BEVERLEY S.M., TURCO S.J. & SACKS D.L. (1994) Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 9155-9159.
- PIMENTA P.F., TURCO S.J., MCCONVILLE M.J., LAWYER P.G., PERKINS P.V. & SACKS D.L. (1992) Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut  
5. *Science* **256**, 1812-1815.
- PONTE-SUCRE A., HEISE D. & MOLL H. (2001) *Leishmania* major lipophosphoglycan modulates the phenotype and inhibits migration of murine Langerhans cells. *Immunology* **104**, 462-467.
- PROUDFOOT L., NIKOLAEV A.V., FENG G.J., WEI W.Q., FERGUSON M.A., BRIMACOMBE J.S. & LIEW F.Y. (1996) Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 10984-10989.
- QI H., JI J., WANASEN N. & SOONG L. (2004) Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect.Immun.* **72**, 988-995.
- REINER N.E., NG W. & MCMASTER W.R. (1987) Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J.Immunol.* **138**, 1926-1932.
- REINER S.L. & LOCKSLEY R.M. (1995) The regulation of immunity to *Leishmania* major  
2. *Annu.Rev.Immunol.* **13**, 151-177.
- REINER S.L., ZHENG S., CORRY D.B. & LOCKSLEY R.M. (1993) Constructing polycompetitor cDNAs for quantitative PCR. *J.Immunol.Methods* **165**, 37-46.
- REINER S.L., ZHENG S., WANG Z.E., STOWRING L. & LOCKSLEY R.M. (1994) *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection  
4. *J.Exp.Med.* **179**, 447-456.
- ROGERS K.A., DEKREY G.K., MBOW M.L., GILLESPIE R.D., BRODSKYN C.I. & TITUS R.G. (2002) Type 1 and type 2 responses to *Leishmania* major  
2. *FEMS Microbiol.Lett.* **209**, 1-7.



- ROGERS K.A. & TITUS R.G. (2003) Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. *Parasite Immunol.* **25**, 127-134.
- ROSENTHAL L.A., SUTTERWALA F.S., KEHRLI M.E. & MOSSER D.M. (1996) *Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infect.Immun.* **64**, 2206-2215.
- SACKS D. & KAMHAWI S. (2001) Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu.Rev.Microbiol.* **55**, 453-483.
- SACKS D.L. (2001) *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol.* **3**, 189-196.
- SACKS D.L., MODI G., ROWTON E., SPATH G., EPSTEIN L., TURCO S.J. & BEVERLEY S.M. (2000) The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 406-411.
- SACKS D.L., PIMENTA P.F., MCCONVILLE M.J., SCHNEIDER P. & TURCO S.J. (1995) Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan 15. *J.Exp.Med.* **181**, 685-697.
- SACKS D.L., SARAIVA E.M., ROWTON E., TURCO S.J. & PIMENTA P.F. (1994) The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence 5. *Parasitology* **108 Suppl**, S55-S62
- SCHAIBLE U.E., SCHLESINGER P.H., STEINBERG T.H., MANGEL W.F., KOBAYASHI T. & RUSSELL D.G. (1999) Parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes 16. *J.Cell Sci.* **112 ( Pt 5)**, 681-693.
- SCHLEIN Y., SCHNUR L.F. & JACOBSON R.L. (1990) Released glycoconjugate of indigenous *Leishmania major* enhances survival of a foreign *L. major* in *Phlebotomus papatasi*. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **84**, 353-355.
- SCHNEIDER P., FERGUSON M.A., MCCONVILLE M.J., MEHLERT A., HOMANS S.W. & BORDIER C. (1990) Structure of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the *Leishmania major* promastigote surface protease. *J.Biol.Chem.* **265**, 16955-16964.
- SCHNEIDER P., ROSAT J.P., RANSIJN A., FERGUSON M.A. & MCCONVILLE M.J. (1993) Characterization of glycoinositol phospholipids in the amastigote stage of the protozoan parasite *Leishmania major*. *Biochem.J.* **295 ( Pt 2)**, 555-564.

- SCOTT P., PEARCE E., CHEEVER A.W., COFFMAN R.L. & SHER A. (1989) Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol.Rev.* **112**, 161-182.
- SOARES R.P., CARDOSO T.L., BARRON T., ARAUJO M.S., PIMENTA P.F. & TURCO S.J. (2005) Leishmania braziliensis: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *Int.J.Parasitol.* **35**, 245-253.
- SPATH G.F. & BEVERLEY S.M. (2001) A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective Leishmania metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp.Parasitol.* **99**, 97-103.
- SPATH G.F., EPSTEIN L., LEADER B., SINGER S.M., AVILA H.A., TURCO S.J. & BEVERLEY S.M. (2000) Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite Leishmania major  
1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 9258-9263.
- SPATH G.F., GARRAWAY L.A., TURCO S.J. & BEVERLEY S.M. (2003a) The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of Leishmania major infections in mammalian hosts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 9536-9541.
- SPATH G.F., LYE L.F., SEGAWA H., SACKS D.L., TURCO S.J. & BEVERLEY S.M. (2003b) Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient Leishmania major  
1. *Science* **301**, 1241-1243.
- STOBIE L., GURUNATHAN S., PRUSSIN C., SACKS D.L., GLAICHENHAUS N., WU C.Y. & SEDER R.A. (2000) The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 8427-8432.
- TEIXEIRA M.J., TEIXEIRA C.R., ANDRADE B.B., BARRAL-NETTO M. & BARRAL A. (2006) Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol.* **22**, 32-40.
- TOLSON D.L., TURCO S.J., BEECROFT R.P. & PEARSON T.W. (1989) The immunochemical structure and surface arrangement of Leishmania donovani lipophosphoglycan determined using monoclonal antibodies. *Mol.Biochem.Parasitol.* **35**, 109-118.
- TURCO S.J. & DESCOTEAUX A. (1992) The lipophosphoglycan of Leishmania parasites  
11. *Annu.Rev.Microbiol.* **46**, 65-94.
- TURCO S.J., HULL S.R., ORLANDI P.A., Jr., SHEPHERD S.D., HOMANS S.W., DWEK R.A. & RADEMACHER T.W. (1987) Structure of the major carbohydrate

fragment of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochemistry* **26**, 6233-6238.

WHITAKER S.M., COLMENARES M., PESTANA K.G. & MCMAHON-PRATT D.  
(2008) The *Leishmania pifanoi* proteoglycolipid complex P8 induces macrophage cytokine production through TLR4. *Infect.Immun.*

Word Health Organization. Leishmaniasis. Word Health Organization. Word Health Organization . 2004. 3-2-2008. (GENERIC)  
Ref Type: Electronic Citation

WORTMANN G.W., ARONSON N.E., MILLER R.S., BLAZES D. & OSTER C.N.  
(2000) Cutaneous leishmaniasis following local trauma: a clinical pearl  
2. *Clin.Infect.Dis.* **31**, 199-201.

ZILBERSTEIN D. & SHAPIRA M. (1994) The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu.Rev.Microbiol.* **48**, 449-470.