



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

LUCILLA RIBEIRO ÁVILA

**Análise da expressão das proteínas META2, LRR17, STI1 e TSA
em isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* obtidos de
pacientes com lesão cutânea ou mucosa**

**Goiânia
2012**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):		LUCILLA RIBEIRO ÁVILA	
E-mail:		lucilla.avila@gmail.com	
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?		☒ Sim ☐ Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento: Sim		Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Sigla: CNPq e CAPES
País:	BRASIL	UF:	GO CNPq: 33654831-0001/36 (CNPq) 00.889.834/0001-08 (CAPES)
Título: Análise da expressão das proteínas META2, LRR17, STI1 e TSA em isolados de Leishmania (Viannia) braziliensis obtidos de pacientes com lesão cutânea ou mucosa			
Palavras-chave: TSA, STI, Meta-2, Leishmania (Viannia) braziliensis, leishmaniose mucosa			
Título em outra língua:			
Analysis of protein expression of META2, LRR17, TSA and STI1 in isolates of Leishmania (Viannia) braziliensis obtained from patients with cutaneous or mucosal lesions			
Palavras-chave em outra língua: TSA, STI, Meta-2, Leishmania (Viannia) braziliensis, mucosal leishmaniasis			
Área de concentração: Imunologia			
Data defesa: (17/02/2012)			
Programa de Pós-Graduação: Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública			
Orientador (a): Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira			
E-mail: mapoliv@usp.com			
Co-orientador (a):* Prof. Dra. Miriam Leandro Dorta			
E-mail: mledorta@gmail.com			

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO²

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, toma-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 09 / 04 / 15

LUCILLA RIBEIRO ÁVILA

**Análise da expressão das proteínas META2, LRR17, STI1 e TSA
em isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* obtidos de
pacientes com lesão cutânea ou mucosa**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Tropical e Saúde Pública da Universidade
Federal de Goiás para obtenção do Título
de Mestre em Medicina Tropical e Saúde
Pública.

Orientador: Prof. Dr. Milton Adriano Pelli
de Oliveira

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Miriam
Leandro Dorta

**Goiânia
2012**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Ribeiro Ávila, Lucilla

Análise da expressão das proteínas META2, LRR17, STI1 e TSA em isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* obtidos de pacientes com lesão cutânea ou mucosa [manuscrito] / Lucilla Ribeiro Ávila. - 2012.

xi, 65 f.

Orientador: Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira; co-orientador Dr. Miriam Leandro Dorta.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) , Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2012.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. *Leishmania braziliensis*. 2. META2. 3. STI1. 4. TSA. 5. leishmaniose mucosa. I. Pelli de Oliveira, Milton Adriano, orient. II. Leandro Dorta, Miriam, co-orient. III. Título.

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Lucilla Ribeiro Ávila

Orientador (a): Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

Membros:

1. Prof. Dr^a. Ana Maria de Castro

2. Prof. Dr. Luis Carlo Crocco Afonso

Data: 17/02/12

*Dedico esse trabalho aos meus pais, **Marcos e Zalira**, aos meus irmãos, **Bruno Henrique e Priscilla** e familiares que estiveram ao meu lado durante toda essa jornada, me apoiando e transmitindo estímulos de força e perseverança. Obrigada por acreditarem em mim.*

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.
As facilidades nos impedem de caminhar.
Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”*

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela força e equilíbrio nos momentos difíceis dessa caminhada;

Ao meu grande orientador Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira por ter me aceito junto à sua equipe de trabalho, pela sua imensa paciência (e coloca paciência nisso!) em me ensinar tudo o que eu sei, por sua contribuição para meu ingresso na vida científica e por ter conseguido fazer eu gostar de Parasito semelhante ao que eu gosto de Imuno. Muito Obrigada mesmo!

À minha co-orientadora Dra. Miriam Leandro Dorta pela contribuição na área de biologia molecular, pelas dicas e sugestões para o resultado final deste trabalho;

À Dra Silvia Reni Bortolin Uliana por ter me recebido durante alguns meses em seu laboratório, pela paciência e sugestões no trabalho;

Às grandes pessoas que conheci durante a minha estadia na USP, Alessandro, Cris e Vivian, que além de contribuírem para meu crescimento científico se tornaram amigos mais que especiais;

À turma do Laboratório de Citocinas, Fernanda, Aryanne, Robertinha e Lohane pelos momentos de boas risadas, pela ajuda em experimentos e nas curvas de crescimento da vida;

Às pessoas especiais que já não estão no laboratório, mas que fizeram parte de bons momentos, Lucas, Walk, Danillo, Mayara, Nayara e Vânia;

Ao Clayson, que tive que aturar durante todo esse tempo (brincadeira, rs). Obrigada, primeiramente, por ter me ensinado a contar leishmânia, pelos momentos de descontração, pelas risadas, pelos estudos nos finais de semana, pelos conselhos, enfim, pela grande amizade que nasceu durante esse Mestrado e que tenho certeza que se estenderá por muito tempo;

À Dra. Fátima Dias e aos demais pesquisadores do departamento pela ajuda de cunho intelectual e por disporem de seu tempo para esclarecimento de dúvidas e pela transmissão de conhecimentos durante as disciplinas;

À todos os amigos que realizei durante essa jornada, que estiveram presentes em momentos de descontração, Ildefonso, Arissa, Camila Imai e Karolzinha. À Adel por sua companhia em estudos e pela amizade. À Bruninha e Mayara Maggioli pelos momentos de descontração, por me socorrerem em finais de semana e sempre que necessitava de ajuda. Obrigada!

Ao Lucas Sampaio, por me acolher em seu laboratório, pela sua imensa paciência e por ter acreditado que eu era capaz. Obrigada!

Ao Dr. Salvador de Carvalho pelo ponta pé inicial, pelo incentivo e pelos bons momentos em que estive em seu laboratório;

À todos os funcionários do IPTSP, em especial a Gilda, responsável por deixar nossos materiais laboratoriais limpinhos e pelo seu bom humor e ao Marco Vitor por nos fornecer camundongos e boas risadas.

Às agências financiadoras desse projeto, CAPES e CNPq.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	i
FIGURAS, TABELA E ANEXO.....	iii
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	v
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Características gerais da leishmaniose.....	1
1.2 Aspectos clínicos da leishmaniose.....	5
1.3 Resposta imune na leishmaniose	6
1.3 Fatores de virulência da leishmânia.....	9
1.4 Mecanismos microbicidas dos macrófagos	12
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo Geral.....	17
3.2 Objetivos Específicos.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Obtenção dos anticorpos anti-META2 e anti-LRR17	18
4.2 Obtenção das proteínas STI1 e TSA em <i>Escherichia coli</i>	18
4.3 Camundongos	19
4.4 Obtenção dos soros hiper-ímunes	19
4.5 Obtenção de formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	19

4.6	Obtenção de formas amastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	20
4.7	Obtenção de extrato protéico total de <i>Leishmania</i>	21
4.8	Eletroforese em SDS-PAGE	21
4.9	<i>Western blot</i> e <i>Immunblotting</i> utilizando quimioluminescência (ECL-HRP) .	21
4.10	Avaliação da expressão de proteínas por citometria de fluxo.....	22
4.11	Análises estatísticas	22
5.	RESULTADOS	24
5.1	Caracterização dos pacientes	24
5.2	Curvas de crescimento <i>in vitro</i> dos parasitos de <i>L.(V.) braziliensis</i>	26
5.3	Detecção da proteína META2 em extratos protéicos totais de promastigotas em fase estacionária de <i>L (V.) braziliensis</i> oriundas de pacientes com lesão cutânea ou mucosa.....	28
5.4	Detecção da proteína LRR17 em extratos protéicos totais de promastigotas em fase estacionária e amastigotas de <i>L (V.) braziliensis</i> oriundas de pacientes com lesão cutânea ou mucosa.....	30
5.5	Detecção da proteína STI1 em extratos protéicos totais de promastigotas em fase estacionária e amastigotas de <i>L (V.) braziliensis</i> oriundas de pacientes com lesão cutânea ou mucosa.....	32
5.6	Detecção da proteína TSA em extratos protéicos totais de promastigotas e amastigotas de <i>L (V.) braziliensis</i> oriundas de pacientes com lesão cutânea ou mucosa	34
6.	DISCUSSÃO	40
7.	CONCLUSÕES	45
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

FIGURAS, TABELA E ANEXO

FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de vida da leishmânia no hospedeiro mamífero e no inseto vetor.....	4
Figura 2 - Curva de crescimento <i>in vitro</i> de <i>L. (V.) braziliensis</i>	27
Figura 3 - Expressão da proteína META2 em extratos proteicos totais de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	29
Figura 4 - Expressão da proteína LRR17 em extratos protéicos totais de promastigotas e amastigotas <i>L. (V.) braziliensis</i>	31
Figura 5 - Expressão da proteína STI1 em extratos protéicos totais de promastigotas e amastigotas <i>L. (V.) braziliensis</i>	33
Figura 6 - Expressão da proteína TSA em extratos proteicos totais de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	35
Figura 7 - Expressão da proteína TSA em extratos proteicos totais de amastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	36
Figura 8 - Expressão da proteína TSA em promastigotas em fase estacionária de <i>L. (V.) braziliensis</i> através de análise citométrica.....	38
Figura 9 - Expressão da proteína TSA em amastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> através de análise citométrica.	39

TABELA

Tabela 1 - Caracterização dos isolados no estudo	25
---	----

ANEXO

Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética.....	53
--	----

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AIF – adjuvante incompleto de Freund

ATP – adenosina trifosfato (do inglês *adenosine-5'-triphosphate*)

B.O.D. – demanda bioquímica de oxigênio (do inglês *biochemical oxygen demand*)

BIR – baculovirus inibidor repetido de apoptose (do inglês *baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat*)

Ca – cálcio

CARD – domínio de recrutamento e ativação de caspase (do inglês *caspase-activating and recruitment domain*)

EDTA - etilenodiaminotetracético

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

FACS - Separação de células ativadas por fluorescência (do inglês *Fluorescence Activated Cell Sorting*)

gp63 – protease de superfície de 63 kDa

GTP – domínio de oligomerização de nucleotídeos (do inglês *nucleotide binding oligomerization domain*)

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HCl – ácido clorídrico

HDT – Hospital de doenças tropicais do Estado de Goiás

ICB/USP – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

IFN γ KO – desprovido do gene para interferon -gama (do inglês *interferon gamma knockout*)

IFN- γ - interferon -gama

IL-12 – interleucina -12

iNOS – óxido nítrico sintase induzida

IPTSP/UFG – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás

Isolcut – isolados oriundos de pacientes com lesão cutânea

Isolmuc – isolados oriundos de pacientes com lesão mucosa

L. - *Leishmania*

LC – leishmaniose cutânea

LD – leishmaniose difusa

LDis – leishmaniose disseminada

Leishbank – Banco imunobiológico de leishmanioses da região Centro-Oeste

LM – leishmaniose mucosa

LNM – leishmaniose do Novo Mundo

LNV – leishmaniose do Velho Mundo

LPG – lipofosfoglicano

LPS – lipopolissacarídeo

LRR – repetições ricas em leucina (do inglês *leucine-rich repeats*)

LRR17 – repetições ricas em leucina do cromossomo 17

LT – leishmaniose tegumentar

LV – leishmaniose visceral

NaCl – cloreto de sódio

NADPH oxidase – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*)

NALP – NACHT, LRR and PYD domains-containing protein

NBS – sítio de ligação de nucleotídeo (do inglês *nucleotide binding site*)

NLR – receptor semelhante a NOD (do inglês *NOD-like receptor*)

nNOS – óxido nítrico sintase neuronal

NO - óxido nítrico

NOD – proteína 1 de domínio de oligomerização de nucleotídeos (do inglês *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1*)

NOS – óxido nítrico sintase

O₂⁻ - ânion superóxido

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONOO⁻ - peroxinitrito

PBS - Solução salina tamponada com fosfato (do inglês *phosphate buffer saline*)

PCR – reação da polimerase em cadeia (do inglês *polymerase chain reaction*)

PFA – paraformaldeído

PPG – proteofosfoglicano

PYD – domínio pirina

rIFN- γ - interferon -gama recombinante

ROS – espécies reativas de oxigênio

RPM – rotações por minuto

SBF – soro bovino fetal

SD – desvio padrão

SDS – dodecil sulfato de sódio (do inglês *sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE - eletroforese em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (do inglês *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

STI1 – proteína induzida pelo estresse 1 (do inglês *stress-inducible protein 1*)

TBST – tampão TRIS-salina e Tween 20 (do inglês *TRIS-buffered saline and Tween 20*)

Th1 – Linfócitos T auxiliares do tipo 1 (do inglês *T helper 1*)

Th2 – Linfócitos T auxiliares do tipo 2 (do inglês *T helper 2*)

TNF- α - Fator de necrose tumoral -alfa

TSA – proteína antioxidante tiol-específica (do inglês *thiol-specific antioxidant protein*)

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

V. – Viannia

RESUMO

Análise da expressão das proteínas META2, LRR17, TSA e STI1 em isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* obtidos de pacientes com lesão cutânea ou mucosa

Introdução: A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é o agente etiológico mais frequente da leishmaniose tegumentar no Brasil. Cerca de 1 a 10% dos pacientes infectados com essa espécie de parasito desenvolvem a leishmaniose mucosa, cujas lesões são progressivas, destrutivas e caracteriza-se por uma forte resposta imune específica. Os mecanismos para o desenvolvimento da leishmaniose mucosa são pouco conhecidos, porém é possível que proteínas associadas à virulência do parasito, como a META2 e o LRR17 e /ou relacionadas com a indução de uma forte resposta imune, como a STI e a TSA, participem da patogênese da doença, ocasionando o aparecimento de metástase na mucosa.

Objetivo: Avaliar a expressão das proteínas META2, LRR17, STI1 e TSA em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* oriundas de lesões cutâneas ou mucosas.

Métodos: Foram utilizados três isolados oriundos de lesões cutâneas de pacientes (JCJ8c, RPL5c e SMB7c) e três isolados oriundos de lesões mucosas (ASL9m, JBC8m e PPS6m). Formas amastigotas dos isolados foram obtidas após o inóculo das biópsias em camundongos deficientes em interferon gama e as formas promastigotas em fase estacionária ou logarítmicas obtidas em cultura em meio de Grace. A cinética do crescimento dos isolados em cultura foi realizada através de contagem diária durante dez dias em citômetro de fluxo. A expressão das proteínas de cada isolado foi avaliada através da técnica de *immunoblotting* e por citometria de fluxo, sendo esta última utilizada somente para avaliar a expressão de proteínas cuja diferença na expressão foi significativa entre os isolados de lesões cutâneas ou mucosas.

Resultados: Promastigotas em fase estacionária dos isolados SMB7c e JBC8m foram as que mais expressaram a proteína META2. A maior expressão desta proteína nos parasitos coincidiu com lesões mais graves, visto que o isolado SMB7c apesar de ser de origem cutânea, o paciente apresentou também lesão na mucosa e no isolado JBC8m o paciente teve o retorno das lesões. As proteínas LRR17 e STI1 não foram expressas em quantidades significativamente diferentes tanto em promastigotas quanto em

amastigotas dos diferentes isolados. A proteína TSA foi expressa em maior quantidade nas formas promastigotas em fase estacionária e em amastigotas dos isolados oriundos de pacientes com lesão mucosa, sendo que essa diferença também foi observada na análise citométrica.

Conclusão: Os resultados sugerem uma associação da proteína META2, que está relacionada com a virulência do parasito, com a geração de lesões mais graves nas mucosas, visto que a maior expressão da proteína foi em isolados de pacientes com lesão mucocutânea e de pacientes que o tratamento não foi eficaz. A TSA, que está associada à antigenicidade e também virulência do parasito foi mais expressa em isolados oriundos de pacientes com lesão mucosa. A hipótese é que, a proteína TSA apesar de induzir uma resposta imune protetora, estaria conferindo proteção da leishmânia após a entrada no fagolisossomo por ser uma proteína antioxidante. Esta proteção favorecia a persistência dos parasitos e mais tarde a geração de lesões na mucosa.

ABSTRACT

Analysis of protein expression of META2, LRR17, TSA and STI1 in isolates of *Leishmania (Viannia) braziliensis* obtained from patients with cutaneous or mucosal lesions

Introduction: *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the most common etiologic agent of cutaneous leishmaniasis in Brazil. About 1 to 10% of patients infected with this species of parasite develop the mucosal leishmaniasis, whose lesions are progressive, destructive and are characterized by a strong specific immune response. The mechanisms for the development of mucosal leishmaniasis are poorly known, but it is possible that proteins associated with virulence of the parasite, such as META2 LRR17 and/or related with the induction of a strong immune response, such as STI and TSA, participate in the pathogenesis disease, causing the appearance of metastases in the mucosa.

Objective: To evaluate the expression of proteins META2, LRR17, STI1 and TSA in promastigotes and amastigotes of *Leishmania (Viannia) braziliensis* derived from cutaneous or mucosal lesions.

Methods: It was used three isolates from cutaneous lesions of patients (JCJ8c, and RPL5c SMB7c) and three isolates from mucosal lesions (ASL9m, and JBC8m PPS6m). Amastigotes of the isolates were obtained after inoculation of biopsies in mice knockout in interferon gamma and promastigotes in logarithmic or stationary phase obtained in culture in Grace's medium. The kinetics of growth in culture of isolates was performed by counting daily over ten days in the flow cytometer. The expression of proteins of each isolate was assessed by immunoblotting technique and by flow cytometry, the latter being used only to evaluate the expression of proteins whose expression was significant difference between isolates from cutaneous or mucosal lesions.

Results: Promastigotes in stationary phase of the isolates SMB7c and JBC8m were the most expressed the protein META2. The greatest expression of this protein in parasites coincided with more severe lesions, since despite of isolated SMB7c being of cutaneous origin, the patient also presented mucosal lesion, and in the isolated JBC8m the patient presented return of lesions. Proteins LRR17 and STI1 were not expressed in significant amount in both promastigotes and amastigotes of different isolates. TSA protein was expressed at higher levels in promastigotes stationary phase and amastigotes of the

isolates from patients with mucosal lesions, and this difference was also observed in flow cytometric analysis.

Conclusion: The results suggest an association of META2 protein, which is related to the virulence of the parasite, with the generation of more severe lesions in the mucosal, since the highest expression of the protein was isolate from patients with mucocutaneous lesions and patients whose treatment was not effective. TSA, which is associated with antigenicity and virulence of the parasite was also expressed in greater amount in isolates from patients with mucosal lesions. The hypothesis is that, despite TSA protein to induce a protective immune response could be conferring protection in the Leishmania after entering the phagolysosomes by being an antioxidant protein. This protection favored the persistence of parasites and later generation of mucosal lesions.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais da leishmaniose

As leishmanioses são doenças causadas por diferentes espécies de parasitos pertencentes à ordem Kinetoplastida; Família: Trypanosomatidae; Gênero: *Leishmania* e Subgênero: *Leishmania* ou *Viannia* (Desjeux 1996; Goto & Lindoso 2010). Os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* se diferem de acordo com o desenvolvimento do parasito no vetor, visto que no primeiro, o desenvolvimento limita-se ao estômago do vetor e no segundo, os parasitos se aderem às paredes do piloro e/ou íleo, através do seu flagelo (Shaw 1994).

A leishmaniose é uma doença endêmica em 88 países, sendo que aproximadamente 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de adoecerem. Estima-se que no mundo exista aproximadamente 12 milhões de pessoas infectadas, com uma incidência de 2 milhões de casos por ano (1,5 milhão de leishmaniose tegumentar e 500.000 de leishmaniose visceral) (WHO 2011).

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é amplamente distribuída nos quatro continentes, em um total de 82 países. A maioria dos casos de LT estão na África (principalmente Etiópia, Marrocos e Tunísia), Oriente Médio (principalmente Afeganistão, Paquistão e Irã) e na América Latina (principalmente Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela). A LT foi considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das mais importantes doenças infecciosas causadas por protozoários, devido ao fato de poder gerar deformidades no indivíduo afetado (Desjeux 2004; Murray et al. 2005; Brasil 2007). No Brasil, ela é uma das doenças endêmicas com grande relevância, sendo relatado em torno de 21.000 novos casos a cada ano na população. Além das deformidades como, por exemplo, no nariz e boca que esta doença pode causar no indivíduo, ela também possui um envolvimento psicológico, podendo ser refletido nos campos sociais e econômicos (Brasil 2007)

A leishmaniose foi tradicionalmente separada em dois grupos: leishmaniose do Novo Mundo (LNM) e Velho Mundo (LVM), as quais se referem à localização geográfica onde a infecção é adquirida. A LVM consiste na doença que é causada por espécies que podem ser encontradas na África, na bacia do Mediterrâneo e Oriente Médio. Dentre as principais espécies causadoras estão: *Leishmania (L.) major*, *Leishmania (L.) tropica* e *Leishmania (L.) aethiopica*, que são responsáveis pela

leishmaniose cutânea (LC) e *Leishmania (L.) donovani* e *Leishmania (L.) infantum*, responsáveis pela forma mais grave da doença, a leishmaniose visceral (LV). A LNM é causada por parasitos que se encontram distribuídos no México, América Central e América do Sul. As principais espécies causadoras da leishmaniose nessas regiões são: *Leishmania (L.) mexicana*, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) guyanensis*, principais agentes etiológicos da LC, podendo essas três últimas espécies causar também a leishmaniose mucosa (LM). Apesar dessas três espécies causarem a LM, no Brasil, a *L. (V.) braziliensis* é a principal espécie responsável pelo desenvolvimento da doença (Brasil 2007). A LV nessas áreas, por sua vez, é causada pela *Leishmania (L.) chagasi* (Brasil 2007;David & Craft 2009;Ameen 2010;WHO 2011).

A transmissão da leishmaniose é realizada por dípteros hematófagos da família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae* (Silveira et al. 1991;Desjeux 2004;Rangel & Lainson 2009). Nos países do NM, esses vetores invertebrados são do gênero *Lutzomyia*, envolvendo aproximadamente 391 espécies e no VM são do gênero *Phlebotomus* (Desjeux 1996). Aproximadamente 30 espécies de *Phlebotomus* foram comprovadas como insetos vetores capazes de transmitir a leishmânia (Rangel & Lainson 2009). No Brasil, esses insetos possuem diferentes nomes populares, dependendo de sua localização geográfica, como: mosquito-palha, mosquito pólvora, catuqui, cangalha, asa branca, birigui, tatuíra (Killick-Kendrick & Molyneux 1981;Bhattacharya et al. 2006).

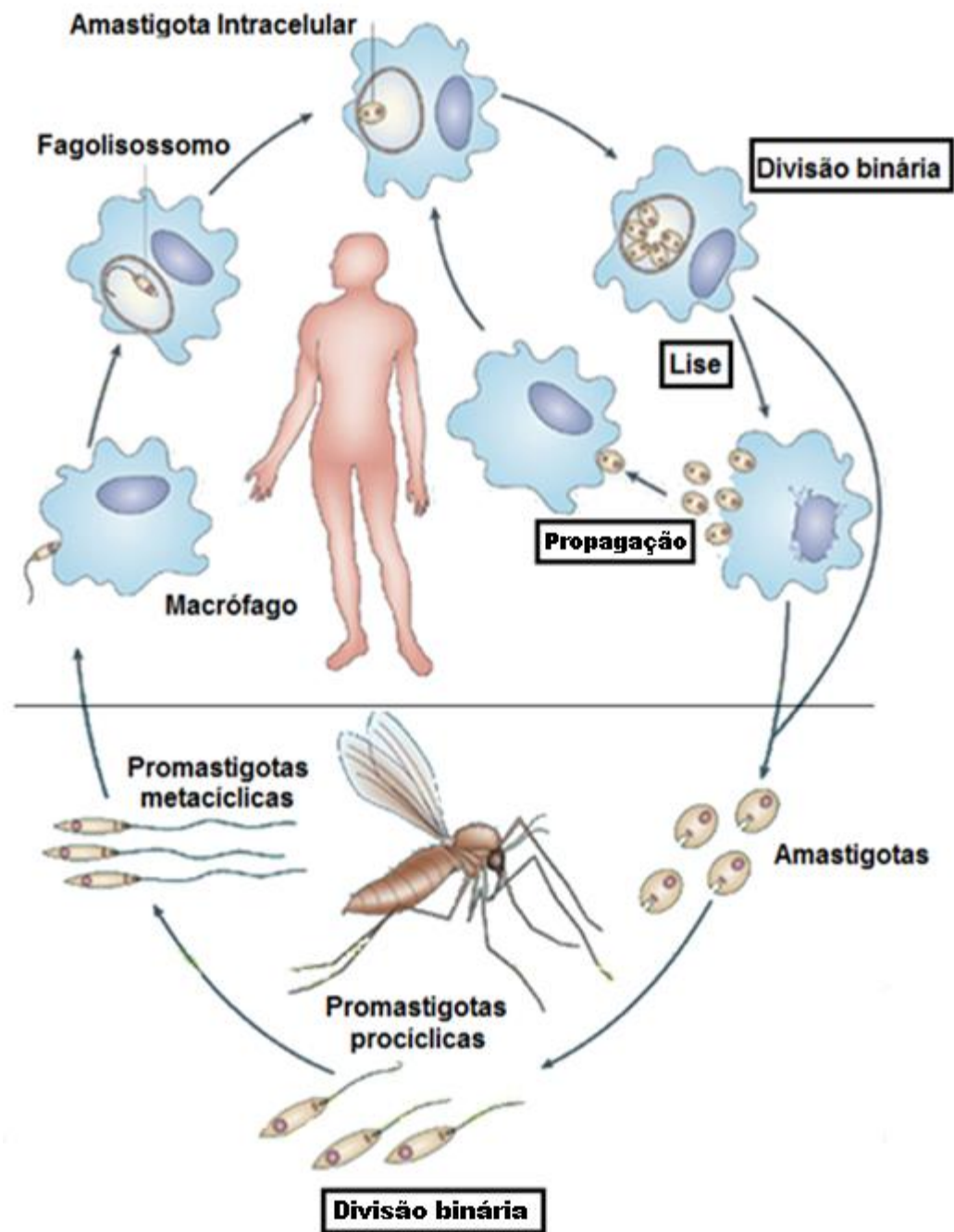
A leishmânia possui o ciclo de vida dimórfico, na qual podem ser encontradas as formas promastigotas extracelulares e amastigotas intracelulares (Sacks et al. 2000). A infecção natural começa quando o inseto vetor inocula aproximadamente 100 a 10.000 formas promastigotas infectantes na pele do hospedeiro (Kimblin et al. 2008). Em humanos, o período de incubação varia de poucas semanas a vários anos antes do começo das manifestações cutâneas, as quais consistem, inicialmente, em um pápula ou nódulo que são caracterizados histologicamente pela presença de macrófagos infectados por amastigotas e um grande infiltrado de células mononucleares na derme (Gutierrez et al. 1991;Sanchez et al. 1992;Weigle & Saravia 1996).

O ciclo de transmissão da leishmaniose inicia-se quando o inseto vetor, durante o repasto sanguíneo, ingere macrófagos infectados com as formas amastigotas, que são as formas aflageladas e ovais ou arredondadas, da leishmânia presentes no hospedeiro vertebrado. Após o rompimento do macrófago, essas amastigotas se transformam em

promastigotas procíclicas, as quais são flageladas e pouco infectantes para os vertebrados; possuem o flagelo curto, são ovóides, ligeiramente móveis e se multiplicam ativamente por divisão binária. Nesta fase, elas passam por uma série de mudanças tanto morfológicas quanto fisiológicas se aderindo ao tubo digestivo do vetor. Ao término desse processo, esses parasitos sofrem um processo de diferenciação denominado metaciclogênese, se tornando promastigotas metacíclicas, que são as formas flageladas infectantes com os flagelos mais longos e corpo delgado. Essas leishmânias migram para as glândulas salivares do inseto e durante um novo repasto sanguíneo as fêmeas do inseto vetor inoculam esses parasitos na pele do hospedeiro. Estes parasitos irão infectar os macrófagos presentes na derme, gerando assim um novo ciclo de transmissão (Sacks & Perkins 1985;Escobar et al. 1992;Sacks 2001) (Figura 1).

Sacks & Perkins 1984 mostraram que os parasitos do gênero *Leishmania* se diferenciam em promastigotas procíclicas e metacíclicas em cultura semelhante ao que é observado dentro do inseto vetor. Na cultura, é observado um padrão distinto de crescimento entre os subgêneros de leishmânia. Parasitos pertencentes ao subgênero *Viannia*, por exemplo, proliferam-se menos em cultura quando comparado com os outros subgêneros (Lainson et al. 1987;Armstrong & Patterson 1994).

Os parasitos do subgênero *Leishmania* entram em fase estacionária de crescimento aproximadamente no quarto dia de cultura, sendo que após o sétimo dia é observado um declínio da população. A *L. (V.) braziliensis* é um exemplo das espécies do subgênero *Viannia* que possui um padrão de crescimento distinto. Os parasitos crescem lentamente e entram em fase estacionária por volta do sétimo dia de cultura (Sacks & Perkins 1984;Torrico et al. 1999).



(modificado de Chappuis et al. 2007)

Figura 1- Representação esquemática do ciclo de vida da leishmânia no hospedeiro mamífero e no inseto vetor.

1.2 Aspectos clínicos da leishmaniose

A leishmaniose compreende diferentes formas clínicas: leishmaniose cutânea (LC), mucosa (LM), difusa (LD), disseminada (LDis) e visceral (LV), dependendo da espécie do parasito e/ou resposta imune desencadeada por este (David & Craft 2009).

A LC é a forma mais comum da leishmaniose e é geralmente restrita às áreas expostas do corpo como a face, couro cabeludo, braços e pernas. As lesões variam de uma a dez e são geralmente do tipo úlceras bem delimitadas e arredondadas que podem ser simples ou múltiplas, visto que na maioria das vezes se curam espontaneamente (Royer & Crowe 2002;Brasil 2007;Goto & Lindoso 2010). Observa-se que apesar de poder ocorrer uma cura da lesão primária, uma lesão metastática pode desenvolver na mucosa com destruição extensa do tecido mole subjacente e da cartilagem, o que indica que a erradicação do parasito não havia acontecido (Saravia et al. 1990).

A LM, também conhecida por “espundia” (Marsden 1994), é uma doença crônica e progressiva que geralmente se localiza no nariz e na boca, porém podem afetar a laringe e a traquéia, gerando deformação e distúrbios respiratórios. Cerca de 1 a 10% de indivíduos infectados com *L. (V.) braziliensis* desenvolvem a LM (Marsden 1985,1994;Amato et al. 2003). Em alguns casos, a leishmaniose mucosa aparece mais precocemente, podendo estar presente simultaneamente com a lesão cutânea (Boaventura et al. 2006). São pouco conhecidos os parâmetros que permitam prever se essas lesões nas mucosas aparecerão em um indivíduo infectado, porém, o risco é aparentemente maior em pacientes que possuem lesões primárias múltiplas, pacientes que apresentaram manifestações clínicas por períodos mais longos que um ano, ou pacientes que não foram tratados, ou o foram de forma intermitente (Jones et al. 1987;Marsden 1994;Grevelink & Lerner 1996;Schubach et al. 1998).

A LD é a forma da LT caracterizada pela ausência de uma resposta imune efetiva, por um grande número de leishmânias fagocitadas dentro de macrófagos e pela presença de lesões nodulares e não ulceradas (Carvalho et al. 1994;Brasil 2007). As lesões são crônicas e disseminadas, assemelhando-se às da lepra, além de serem mais difíceis de curar (Pinheiro 2004;Pereira et al. 2009). As principais espécies causadoras são a *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis*, sendo esta última a principal espécie que causa a LD no Brasil (Brasil 2007;Goto & Lindoso 2010;Morrison et al. 2010).

A LDis é mais rara, aparecendo em aproximadamente 2% dos casos de LT. Na sua fase inicial, nota-se a presença de úlceras isoladas que subsequentemente evoluem para centenas de lesões que são dolorosas e purulentas, sendo elas principalmente acneiformes e papulares. Em até 30% dos casos observaram-se também o acometimento simultâneo das mucosas, além de manifestações sistêmicas (Turetz et al. 2002;Brasil 2007;Reithinger et al. 2007). Indivíduos que desenvolvem essa forma da doença conseguem montar uma resposta imune contra os parasitos, além de apresentarem uma boa resposta terapêutica. As espécies reconhecidas como causadoras dessa doença são a *L (V.) braziliensis* e *L.(L.) amazonensis* (Brasil 2007).

A LV, também conhecida como “kalazar”, é a forma mais grave da leishmaniose, podendo levar o indivíduo a morte (Desjeux 2004). Os parasitos são encontrados principalmente no baço, medula óssea, fígado e linfonodos. As características clínicas da doença consistem em febre, emagrecimento, hepatoesplenomegalia e pancitopenia (Herwaldt 1999;Costa et al. 2010).

Na LV parece ocorrer uma inabilidade de células T produzirem IFN- γ e IL-12 e consequentemente serem capazes de ativarem os macrófagos para matarem a leishmânia (Sundar et al. 1997). Em estudos mais recentes é mostrado o papel da IL-10 na patogênese, gerando uma resposta imunossupressora, a qual inibe a polarização para uma resposta imune protetora do tipo Th1(Bhattacharjee et al. 2009). Além disso, na LV nota-se que existe uma alta produção de anticorpos específicos para antígenos da leishmânia antes mesmo de ser detectada uma resposta celular específica (Ghose et al. 1980).

1.3 Resposta imune na leishmaniose

Para que ocorra uma resposta imune específica às leishmânias é necessário que haja, em primeiro lugar, interações destes parasitos com receptores da imunidade inata presentes em macrófagos e/ou células dendríticas. Dentre os receptores que já foram vistos em interagirem com as leishmânias estão os receptores Fc (do inglês, *fragment, crystallizable*), receptores de manose, receptores semelhantes a toll (TLRs, do inglês *toll-like receptor*) e o receptor do complemento 3 (CR3, do inglês, *complement receptor 3*) (Wilson & Pearson 1986;Saraiva et al. 1987;Kima et al. 2000;Kedzierski et al. 2004a;Vargas-Inchaustegui et al. 2009).

Estudos mostraram que a sinalização através de TLRs são essenciais para a resposta imune contra as leishmânias. Foi demonstrado que o LPG de *L. (L.) major* induz a produção de IL-12 p40 e TNF- α por macrófagos derivados da medula óssea de uma maneira depende de TLR-2. Já em estudos com células dendríticas foi visto que TLR-2 parece ter um papel regulatório durante a infecção com *L. (V.) braziliensis* (de Veer et al. 2003; Tuon et al. 2008; Vargas-Inchaustegui et al. 2009).

Após a resposta imune inata, uma resposta imune específica à leishmaniose é montada, sendo mediada principalmente por linfócitos T. Muito do que se sabe acerca da imunologia da leishmaniose se deve a estudos utilizando modelos clássicos de infecção murina por *L. (L.) major*. Nestes modelos observa-se o paradigma T auxiliar 1/T auxiliar 2 (Th1/Th2, do inglês T *helper* 1/T *helper* 2) de resistência *versus* suscetibilidade. A interleucina-4 (IL-4) direciona para a resposta imune do tipo Th2 em camundongos susceptíveis, como os BALB/c, enquanto a citocina interleucina-12 (IL-12) direciona para uma resposta Th1 associada à resistência em camundongos C57BL/6 (Scott & Farrell 1998; Sacks & Noben-Trauth 2002). A destruição destes parasitos ocorre no fagolisossomo dos macrófagos e envolve a produção de óxido nítrico (NO) pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) expressa após a ativação do macrófago pelas citocinas interferon -gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral -alfa (TNF- α), além da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são induzidas também por essas duas citocinas (IFN- γ e TNF- α). As ROS também podem ser induzidas pela fagocitose (Liew et al. 1990; Cunha et al. 1993; Reiner & Locksley 1995; Murray & Nathan 1999).

Os mecanismos imunológicos de controle do patógeno em modelos murinos infectados por *L. (L.) major* já estão bem estabelecidos, ao contrário dos modelos murinos de infecção por *L. (V.) braziliensis* (Coutinho et al. 1996). Nestes últimos, estudos mostraram que ambos, IFN- γ e IL-12p40 são componentes de uma resposta imune protetora. Foi visto também que a IL-12, STAT4, iNOS e TNF são essenciais para a cura de uma infecção local, enquanto o NADPH oxidase parece não ser tão importante (DeKrey et al. 1998; de Souza-Neto et al. 2004; Rocha et al. 2007). Alternativamente, outro estudo realizado por Khouri et al. 2010 demonstrou que quando utilizado um inibidor da superóxido dismutase, houve um aumento da morte de isolados de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* por macrófagos humanos, *in vitro*, e em modelos murinos, *in vivo*. Sendo assim, parece que alguns isolados de *L. (V.) braziliensis* são mais susceptíveis a morte por ROS do que outros isolados.

Em humanos, a resposta imune na LM é caracterizada por um rico infiltrado inflamatório associado a uma forte resposta inflamatória, observando-se nestas lesões a presença de uma pequena quantidade de parasitos ou até mesmo a ausência destes (Bittencourt & Barral 1991). Os mecanismos imunes na LM ainda são pouco conhecidos, porém estudos utilizando células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) demonstraram que esta doença é caracterizada por elevados níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ e uma baixa produção da citocina anti-inflamatória IL-10 quando comparado com pacientes com LC (Caceres-Dittmar et al. 1993; Bacellar et al. 2002). Foi mostrado também o papel da citocina IL-4 na patogênese da LM. Através de um estudo analisando RNA mensageiro de biópsias de pacientes foi encontrado que em lesões mucosas existe uma maior quantidade de IL-4 do que lesões cutâneas (Pirmez et al. 1993).

Apesar do TNF- α e IFN- γ serem citocinas capazes de ativar os macrófagos para matar o parasito, na LM nota-se uma inabilidade destas em controlarem a infecção com *L. (V.) braziliensis*, sendo observada uma resposta imune mais exacerbada quando comparada com a LC e um aumento de células T efetoras ativadas que mantêm uma resposta inflamatória gerando os danos teciduais (Blackwell 1999; Carvalho et al. 2007).

Em pacientes que possuem a LM ativa, foi demonstrado que, os níveis de IFN- γ e interleucina-5 (IL-5), que fazem parte dos perfis Th1 e Th2, respectivamente, são maiores comparados com o da LC ativa, mostrando também neste mesmo estudo que pacientes que desenvolveram a cura da LM tiveram um nível aumentado de IFN- γ e diminuído os níveis de IL-5 com nenhuma produção de IL-4, sugerindo que a destruição dos tecidos da mucosa não se deve somente a presença de um perfil misto Th1/Th2 junto a uma reação exacerbada das células T, mas também uma ausência de regulação da rede de citocinas (Da-Cruz et al. 2002).

Além do perfil misto Th1/Th2 que é notado em lesões causadas por *L. (V.) braziliensis*, outros subtipos de células, as células T reguladoras (T regs) que são produtoras de IL-10 e/ou fator de transformação de crescimento-beta (TGF- β), já foram identificados em lesões de pacientes portadores de LC, cuja função principal é de controlar a infecção através do controle da resposta inflamatória exacerbada ocasionada causada pelo parasito (Campanelli et al. 2006).

1.3 Fatores de virulência da leishmânia

Sabe-se que os parasitos do gênero *Leishmania* passam por dois estágios de vida, um dentro do inseto vetor, como promastigotas, e outro dentro de macrófagos, como amastigotas. Para poderem sobreviver nestes dois ambientes biológicos distintos, estes parasitos passam por adaptações tanto bioquímicas como morfológicas (Alexander et al. 1999). As formas amastigotas presentes em macrófagos são mais infectantes do que as flageladas. Dentre as formas encontradas no inseto vetor ou em cultura, as mais infectantes são as promastigotas metacíclicas em relação às procíclicas, as quais estão presentes na fase estacionária e fase logarítmica de crescimento, respectivamente (Chang et al. 1990;Puentes et al. 1990). As formas promastigotas e amastigotas expressam moléculas estágio-específico em sua superfície, as quais podem ser consideradas fatores de virulência por serem críticas para interações que envolvem a ligação e invasão do macrófago do hospedeiro, primeiramente por promastigotas e depois por amastigotas (Handman 1999;Kedzierski et al. 2004b;Genestra et al. 2006). Esses fatores de virulência podem estar associados com a resposta imune do hospedeiro, uma vez que a resposta imune pode atuar tanto na proteção quanto no desenvolvimento da doença (Chang et al. 2003).

As leishmânias expressam uma família de glicoconjugados que contém fosfoglicanos. Dentro desta família está o lipofosfoglicano (LPG) que está ligado a membrana e os proteofosfoglicanos (PPG), os fosfoglicanos e a fosfatase ácida que estão na forma secretada (Handman 1999;Turco et al. 2001). O LPG é expresso principalmente na superfície de promastigotas, sendo encontrado em pequena quantidade em amastigotas (Ilgoutz & McConville 2001).

O LPG pode se ligar com moléculas dos insetos vetores, o que sugere que esses glicoconjugados são necessários para a manutenção do ciclo da leishmânia na natureza. Estas moléculas também são importantes na proteção do parasito no momento em que entram nos hospedeiros vertebrados, onde são expostos a lise pelas proteínas do complemento. Além disso, ao entrarem no fagolisossomo, as leishmânias utilizam também os LPG para as protegerem da ação de enzimas hidrolíticas e outros mecanismos microbicidas como as ROS e RNIs. Essa proteção pode ser devido à dificuldade dessas enzimas em penetrarem a camada de PPG na superfície dos parasitos (Turco & Descoteaux 1992;Handman 1999;Sacks et al. 2000).

Chang e Chang (1986) identificaram uma glicoproteína de 63kDa, também conhecida como gp63, leishmanolisina ou PSP. A expressão reduzida desta proteína foi capaz de inibir a ligação de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* aos macrófagos, mostrando assim seu papel na infecção de células hospedeiras. Esta glicoproteína, que está ligada a um glicolípido chamado glicosilfosfatidilinositol, encontra-se abundantemente expressa na superfície de promastigotas de todas as espécies de *Leishmania* (Chang et al. 1986;Thiakaki et al. 2006).

Além da gp63 e dos PPG, existem várias outras proteínas relacionadas como fatores de virulência neste parasito. Em um estudo realizado por Abu-Dayyeh et al. (2010), foi demonstrado que tanto as formas promastigotas quanto as amastigotas de *L. (L.) mexicana* bloqueiam a produção de óxido nítrico interferindo nas vias sinalização mediada pelo IFN- γ , através de uma proteinase cinase, a LmCPb, mostrando que esta proteína pode desempenhar um papel crítico na sobrevivência destes parasitos.

A proteína META1 é expressa principalmente em formas promastigotas dos parasitos e é regulada positivamente durante a metaciclogênese. O gene foi inicialmente identificado em *L. (L.) major*, mas posteriormente mostrou ser altamente conservado em todas as espécies de *Leishmania* testadas, incluindo *L. (V.) braziliensis* (Berberich et al. 1998;Gamboa et al. 2007). A super expressão deste gene em *L. (L.) amazonensis* promoveu uma doença mais grave quando os parasitos foram inoculados em camundongos (Uliana et al. 1999), demonstrando sua relação com a virulência do parasito. Além do gene META1, parasitos do gênero *Leishmania* também expressam outro gene denominado META2, cuja proteína sintetizada possui três repetições do domínio META (Ramos et al. 2004). Essa proteína mostrou-se envolvida em uma resposta de estresse em *L. (L.) amazonensis*, onde foi capaz de conferir resistência ao choque térmico e estresse oxidativo (Ramos et al. 2011).

O gene LRR17 (*Leucine-rich repeats* do cromossomo 17) também apresenta expressão regulada durante o ciclo de vida de *L. (L.) amazonensis*. Este gene foi identificado nas vizinhanças dos genes META-1 e META-2 no cromossomo 17 desses parasitos. Diferentemente das proteínas META, a proteína LRR17 apresenta-se em maior abundância em *L. (L.) amazonensis* nas formas amastigotas do parasito, porém em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major*, ele foi mais expresso nas formas promastigotas (Franco 2008). Foi mostrado também por Franco et al. 2008 que a proteína LRR17 de *L. (L.) major* expressa em *L. (L.) amazonensis* aumentou a virulência do parasito *in vitro*. A sequência de aminoácidos da proteína apresenta similaridade com a proteína NOD3

humana e contém, em sua região carboxi-terminal, seis repetições ricas em leucina (LRR) (Franco 2008).

A proteína NOD3 humana faz parte de uma família de proteínas NLRs (do inglês, *nucleotide-binding domain leucine-rich repeat*), sendo também nomeadas de CATERPILLER (CARD [do inglês, *caspase recruitment domain, transcription enhancer purine binding, lots of leucine repeats*]) (Harton et al. 2002;Ting et al. 2006), NOD (do inglês, *nucleotide-binding and oligomerization domain leucine-rich repeat*) (Inohara & Nunez 2003) ou *NOD-like receptors* (Meylan et al. 2006).

As NLRs mais bem caracterizadas são NOD1 e NOD2, que são codificadas pelo gene 4 de CARD4 e CARD15, respectivamente. Estas proteínas são receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) da imunidade inata e funcionam como sensores intracelulares da infecção bacteriana (Inohara et al. 2002;Strober et al. 2006). Essas proteínas caracterizam-se por possuir três domínios: a região carboxi-terminal contém motivos repetitivos, em sua maioria LRR; na região central são encontrados motivos de ligação e clivagem de ATP ou GTP (*nucleotide binding oligomerization domain* – denominado NOD, NBS ou NACHT) e a região amino-terminal é constituída por um domínio efetor, de interação proteína-proteína (Chamaillard et al. 2003).

Além de genes que foram associados com virulência, existem outros, que por sua vez estão ligados com a imunogenicidade. A TSA (*thiol-specific antioxidant protein*) é uma proteína abundantemente expressa nas superfícies celulares de promastigotas e amastigotas, sendo encontradas múltiplas cópias do gene em todas as espécies de leishmânias analisadas (Salay et al. 2007;Tabatabaie et al. 2007). A proteína TSA recombinante juntamente com STI1 de *L. (L.) major* (do inglês, *stress inducible protein 1*) foram utilizadas em vacinas de subunidades, as quais induziram proteção tanto em camundongos quanto em modelos primatas (macaco-*rhesus*) com leishmaniose cutânea (Campos-Neto et al. 2001;Salay et al. 2007). A proteína STI1 foi caracterizada primeiramente em *S. cerevisiae* e mostrou-se ser altamente conservada em plantas a humanos, sendo classificadas como proteínas de choque térmico pelo fato de serem reguladas positivamente pelo choque térmico e outros estresses (Nicolet & Craig 1989). Além da vacinação genética, outros estudos com esses dois antígenos (TSA e STI1) estão sendo utilizados em estratégias de imunização com poliproteínas em formulação separadas ou conjuntas, ficando visível em todos os casos, a proteção em modelos de animais desafiados com *L. (L.) major* (Mendez et al. 2001;Coler et al. 2002;Skeiky et al. 2002;Chakravarty et al. 2011).

1.4 Mecanismos microbicidas dos macrófagos

Os macrófagos possuem diversos mecanismos que atuam como potentes agentes microbicidas contra a infecção por diversos patógenos. Um desses mecanismos é a explosão respiratória, que pode ser definida como um aumento dos níveis de metabólitos de oxigênio no interior dos macrófagos. Essa explosão respiratória gera espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A inibição da explosão respiratória pode contribuir para a permanência e sobrevivência de patógenos no fagolisossoma de macrófagos (Buchmuller-Rouiller & Mauel 1987; Forman & Torres 2002). Este mecanismo microbicida pode ser encontrado principalmente em neutrófilos e macrófagos, o qual é dependente de um complexo multienzimático chamado nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) oxidase. Durante a fagocitose, as proteínas citosólicas, que compõem esse complexo, são translocadas para a membrana plasmática ou do endossoma a fim de formarem um complexo NADPH oxidase ativo. (Forman & Torres 2002; Blos et al. 2003). O NADPH ativo reduz o oxigênio extracelular em O_2^- , que por sua vez reage sob ação de uma enzima chamada superóxido dismutase para formar H_2O_2 e em O_2 . Alternativamente, os radicais altamente reativos do oxigênio podem reagir com outras moléculas extracelulares. Em macrófagos, além de atuar como um mecanismo de defesa no fagolisossoma, o H_2O_2 pode atuar também como mensageiro, interferindo nas vias de sinalização intracelular (Iles & Forman 2002).

Além das ROS, outro mecanismo microbicida utilizado por macrófagos é a produção de espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO), que é um radical livre sintetizado a partir de um substrato, a L-arginina que é convertida em citrulina por uma família de enzimas chamadas óxido nítrico sintases (NOS). Existem três isoformas de NOS, duas delas são expressas constitutivamente, a NOS neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS) que estão presentes no citosol e são dependentes da via de cálcio (Ca^{2+})/calmodulina. A terceira isoforma é induzida (iNOS) atuando de uma maneira independente de Ca^{2+} (Moncada et al. 1991; Estevez & Jordan 2002). O NO derivado do nNOS e eNOS foi identificado como sendo uma importante molécula de sinalização, estando envolvido diversas funções fisiológicas, como por exemplo nas funções de neurotransmissor, neurotoxicidade, regulação do tônus vascular e inibição da agregação plaquetária (Copp et al. 2011; Rafikov et al. 2011).

A iNOS está presente em vários tipos celulares como macrófagos, neutrófilos e fibroblastos, sendo induzida em resposta a diversos estímulos antigênicos, como lipopolissacarídeos (LPS) e também por citocinas (IFN- γ e TNF- α). O NO derivado dessa enzima funciona como uma importante molécula microbicida em diversas infecções por patógenos, incluindo leishmânias (Liew et al. 1990; Liew et al. 1997).

O NO, sendo um radical livre, pode se combinar com O_2^- e gerar um produto ainda mais tóxico, o peroxinitrito (ONOO $^-$), que por sua vez, quando presente pode causar danos teciduais durante a inflamação (Beckman 1991; Moncada et al. 1991). Foi demonstrado *in vitro* que o peroxinitrito e outros radicais são potentes agentes leishmanicidas na infecção com *L. (L.) amazonensis* e que ambos NO e ONOO $^-$ são formados durante a infecção utilizando camundongos BALB/c (Augusto et al. 1996; Linares et al. 2001). Porém, é sugerido que a presença de peroxiredoxinas nas leishmânias possa protegê-las contra a toxicidade de ONOO $^-$ (Barr & Gedamu 2003).

Na leishmaniose experimental ou humana desencadeada pela *L. (L.) major* observa-se que os linfócitos T CD4 $^+$ e T CD8 $^+$ produzem IFN- γ e ativam os macrófagos para a produção de iNOS e fagócito oxidase (Sacks & Noben-Trauth 2002; Blos et al. 2003).

Em um estudo de Khouri et al. 2010 foi mostrado que quando utilizado um inibidor da superóxido dismutase, houve um aumento da morte de diferentes cepas de leishmânias por macrófagos humanos, *in vitro*, e em modelos murinos, *in vivo*. Por outro lado, em outro estudo realizado *in vitro* e *in vivo* foi demonstrado que o NADPH oxidase não foi necessário para controlar a infecção por *L. (V.) amazonensis* (Mukbel et al. 2007). Outros estudos mostram a resistência em diversas espécies de *Leishmania* ao NO, sendo essa resistência mediada por derivados de ácido siálico, uma vez que elevados níveis desses derivados correlacionava com o aumento da resistência ao NO e permitia a sobrevivência dos parasitos (Ghoshal et al. 2010). Em outro trabalho, foi demonstrado *in vitro* que *L. (L.) amazonensis* induziu a inibição da síntese de óxido nítrico em macrófagos da linhagem J774-G8, sendo esse efeito de inibição revertido quando a cultura de células foram estimuladas com LPS e rIFN- γ (Balestieri et al. 2002). Giudice et al. 2007 encontrou diferenças entre os isolados de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* em relação a suscetibilidade ao NO, mostrando que a maior resistência encontrada em alguns isolados correlacionava com a maior quantidade de lesões ulceradas nos pacientes, sugerindo então que a resistência ao NO poderia levar ao surgimento de formas clínicas mais agressivas.

Apesar dos potentes mecanismos microbicidas dos macrófagos, as leishmânias são capazes de infectar e se multiplicarem dentro dessas células. Isso se deve ao fato das várias estratégias desenvolvidas por estes parasitos para conseguirem escapar dos mecanismos de defesa e sobreviverem dentro dos macrófagos para o desenvolvimento da doença (Balestieri et al. 2002; Genestra et al. 2006).

2. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose é uma doença que pode ser causada por diferentes espécies de parasitos do gênero *Leishmania*. Está distribuída em todo o mundo e no Brasil está distribuída em todas as regiões, observando-se uma grande incidência principalmente nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do país (Brasil 2007).

Muito do que se sabe acerca da leishmaniose se deve a estudos realizados em modelos experimentais de infecções murinas por *L. (L.) major*, onde foi possível constatar o paradigma de resistência *versus* suscetibilidade à doença. Porém, viu-se que esse paradigma não se aplicava a outras espécies de leishmânias, inclusive em *L. (V.) braziliensis* (McMahon-Pratt & Alexander 2004; Tripathi et al. 2007).

Existem ainda muitas dúvidas em relação à infecção por *L. (V.) braziliensis*. A doença que é causada por essa espécie tem como resultado úlceras que se desenvolvem na região da pele e que geralmente se curam espontaneamente. Porém, após aparente cura de uma lesão primária, dentro de alguns meses ou anos aproximadamente 10% dos indivíduos infectados desenvolvem uma lesão metastática na mucosa que se estende por todo o tecido mole (Carvalho et al. 1994; Carvalho et al. 2007).

Os parâmetros que preveem se indivíduos infectados com a *L. (V.) braziliensis* irão desenvolver a LM ainda são muito poucos. Porém, alguns estudos apontam que polimorfismos nos genes de indivíduos possam estar envolvidos na susceptibilidade para LM. Outros estudos, por sua vez, mostraram que fatores presentes no próprio parasito possam ser responsáveis pelo surgimento dessas lesões mais graves. Nestes estudos foi demonstrado que parasitos obtidos de lesões mucosas possuem uma maior atividade da enzima arginase, ecto-nucleotidase, além de serem mais resistentes ao NO do que os de lesão cutânea. Outros estudos apontam que a presença de um vírus (LRV1) que pode ser albergado pela leishmânia possa estar envolvido no resultado clínico da doença (Jones et al. 1987; Marsden 1994; Giudice et al. 2007; Ramasawmy et al. 2010; Vendrame et al. 2010; Daneshbod et al. 2011; Leite et al. 2012).

Sabendo da importância do parasito na geração de lesões das mucosas, este trabalho visou analisar a expressão de proteínas em *L. (V.) braziliensis*, as quais foram mostradas estarem relacionadas com a virulência ou com a imunogenicidade do parasito.

Proteínas associadas à virulência poderiam atuar na proteção das leishmânias, fazendo com que estas últimas se adaptem melhor ao ambiente intracelular do

hospedeiro protegendo-as contra os mecanismos microbicidas de macrófagos. Por outro lado, proteínas associadas à imunogenicidade do parasito poderiam estar induzindo uma resposta imune mais intensa, com um maior controle dos parasitos, porém, com maior lesão tecidual.

Para avaliar a variabilidade da expressão destas proteínas foram utilizados isolados de obtidos de lesão cutânea ou de lesão mucosa causada pela *L. (V.) braziliensis*. A expressão proteica foi avaliada nas diferentes fases dos parasitos (promastigotas logarítmicas, estacionárias e amastigostas), visto que possivelmente durante a fase infectante, a leishmânia poderia estar expressando maiores quantidades de proteínas as quais gerariam proteção após entrada no macrófago do hospedeiro.

A maior expressão de proteínas associadas a virulência em isolados de lesão mucosa poderia explicar, em parte, as diferentes formas clínicas, sendo possível, em um futuro próximo, funcionar como um marcador prognóstico da LM em indivíduos infectados com *L. (V.) braziliensis*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão das proteínas META2, LRR17, STI1 e TSA em formas promastigotas e amastigotas de *L. (V.) braziliensis* oriundas de pacientes com lesão cutânea ou mucosa.

3.2 Objetivos Específicos

- Comparar o crescimento *in vitro* de isolados oriundos de pacientes com lesão cutânea e mucosa durante dez dias;
- Comparar o crescimento *in vitro* de isolados oriundos de pacientes com lesão cutânea e mucosa durante dez dias;
- Comparar a expressão protéica de META2, LRR17, STI1 e TSA em isolados oriundos de pacientes com lesão cutânea ou mucosa nas formas promastigotas em fase estacionária e amastigotas através do ensaio de *immunoblotting*;
- Implantar e comparar a técnica de citometria de fluxo com o *immunoblotting* para análise da expressão das proteínas META2, LRR17, STI1 e TSA em isolados oriundos de pacientes com lesão cutânea ou mucosa;
- Avaliar a expressão das proteínas que foram diferentes por *immunoblotting* na citometria de fluxo, nos isolados oriundos de pacientes com lesão cutânea ou mucosa nas formas promastigotas em fase estacionária, fase logarítmica e amastigota.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos anticorpos anti-META2 e anti-LRR17

Os anticorpos anti-META2 e anti-LRR17 foram cedidos gentilmente pela Prof. Dr^a. Silvia Reni Bortolin Uliana (USP/ICB - São Paulo, SP).

4.2 Expressão e purificação das proteínas STI1 e TSA em *Escherichia coli*

Foram utilizados os plasmídios pHis recombinantes em bactéria *E. coli* BL-21 transformadas (Skeiky et al. 2002). Uma colônia contendo cada um dos plasmídios foi incubada em meio SOB (do inglês *Super Optimal Broth*) contendo 100 µg/mL de ampicilina a 37°C com agitação de 200 rpm. Quando o crescimento bacteriano atingiu DO₆₀₀ entre 0,6-0,8, foram acrescidos 100 µg/mL de ampicilina e 0,1 mM de IPTG (isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosídeo) (GIBCO/BRL). Em seguida, a incubação foi realizada a 30°C com agitação de 150 rpm durante a noite. Os precipitados bacterianos foram ressuspensos em solução de uréia 8 M e guanidina 6 M em salina tamponada com fosfato [PBS, do inglês *phosphate buffer saline* (6 mM NaH₂PO₄; 7,4 mM Na₂HPO₄; 140 mM NaCl pH 7,2)]. Após solubilização das proteínas, este material foi analisado por SDS-PAGE (Laemmli 1970) a fim de verificar a expressão proteica pela bactéria. Em seguida, as proteínas foram purificadas em gel de SDS-PAGE 12% e, depois de realizada a eletroforese, foi adicionado ao gel solução de KCl (5,6g de KCl em 300 mL de H₂O) gelado para precipitar as proteínas. Tiras dos géis contendo a proteína foram centrifugadas a 3500 rpm por 20 minutos e o sobrenadante colocado em saco de diálise (Spectra/Por® Biotech). Em seguida, foi realizada a diálise em PBS a 4°C por 24 h. A proteína purificada foi avaliada por SDS-PAGE quanto a sua pureza. Foi realizada a dosagem das proteínas (Bradford protein assay kit) e logo após, as proteínas foram estocadas em microtubos contendo 10 µL/mL de coquetel inibidor de protease [200 mM PMSF; 2,0 M benzamidina; 10 mM leupeptina; 5,0 mM fenantrolina; 50 mg/mL inibidor de tripsina (SIGMA)] a -20°C.

4.3 Camundongos

Foram utilizados camundongos C57BL/6 (B6.129S7-ifng^{tm1Ts}) desprovidos do gene para INF γ (IFN γ KO) cujas matrizes foram cedidas pela Dr^a Leda Quércia Vieira (Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia, UFMG - Belo Horizonte, MG) para a obtenção das formas amastigotas dos parasitos. Camundongos BALB/c foram utilizados para a obtenção dos soros hiperimunes. Os animais foram utilizados quando atingiram 6-12 semanas de idade. Foram utilizados neste projeto machos ou fêmeas indistintamente, os quais foram mantidos em gaiolas separadas. As matrizes foram mantidas no Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG). Nos experimentos os camundongos foram mantidos em estantes ventiladas (UNO BV, Holanda) com alimentação e água a vontade, e utilizados nas infecções como descrito posteriormente. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa humana e animal do Hospital das Clínicas/UFG (Anexo 1).

4.4 Obtenção dos soros hiper-imunes

Camundongos BALB/c foram injetados no dorso com 10 μ g de cada uma das proteínas recombinantes emulsificadas em adjuvante incompleto de Freund (AIF) [50 μ l de proteína diluída em PBS + 50 μ L de AIF (SIGMA)], com intervalos de 30, 60 e 90 dias. Animais controles foram inoculados apenas com AIF. Trinta dias após o último inóculo foi realizada a coleta de sangue dos animais por punção cardíaca. O sangue foi centrifugado para separação do soro, sendo este último aliquoteado e em seguida armazenado a -20°C.

4.5 Obtenção de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*

Parasitos isolados de biópsias de pacientes com lesão cutânea (*isolcut*; JCJ8c, RPL5c e SMB7c) ou lesão mucosa (*isolmuc*; ASL9m, JBC8m e PPS6m) foram sorteados aleatoriamente do Banco imunobiológico de leishmanioses da região Centro-Oeste (Leishbank). Somente participaram deste trabalho parasitos que foram

previamente confirmados como pertencentes ao subgênero *Viannia* pela técnica da reação de polimerase em cadeia (PCR) com iniciadores específicos para 6GPD (Passos et al. 1996; Volpini et al. 2004). Estes parasitos foram cultivados em meio de Grace (Grace's Insect Medium, Sigma Chemical Co., NY, EUA) suplementado com 20% de SBF (Soro Bovino Fetal, Cripion, São Paulo) inativado (56 °C por 1 h), 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (SIGMA) em placas de 24 poços (TPP, Suíça) a 26 °C em estufa B.O.D. [do inglês *Biochemical Oxygen Demand* (Eletro Lab, São Paulo, SP)]. A cinética de crescimento dos isolados foi realizada através de contagem diária, durante dez dias, em hemocitômetro, com a diluição de uma alíquota da suspensão em paraformaldeído (PFA) (MERK) 0,2% em PBS. Alternativamente a contagem foi realizada em citômetro de fluxo (Accuri's C6 Flow Cytometer® System). As passagens dos parasitos para novo meio de cultura foi realizada a cada dois ou três dias, sendo utilizados nos experimentos os parasitos entre terceira e quinta passagem. A cultura foi sempre iniciada com 1×10^6 promastigotas/mL, sendo utilizados no estudo promastigotas em fase estacionária (oito dias de cultura), promastigotas em fase logarítmica (três dias de cultura) e amastigotas, obtidas como descrito posteriormente. As promastigotas nas diferentes fases obtidas foram lavadas três vezes em PBS para análise em citometria de fluxo ou estocadas a -70°C na presença de inibidor de protease para posterior lise e obtenção de extrato total proteico para análise em western-blotting.

4.6 Obtenção de formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*

Formas amastigotas foram mantidos em camundongos IFN γ KO como descrito anteriormente (Oliveira et al. 2010). Amastigotas recém descongeladas foram lavadas duas vezes com PBS, e 1×10^6 formas amastigotas foram inoculadas no coxim plantar dos animais. Após a lesão atingir 3 milímetros, os animais foram sacrificados por decapitação e as formas amastigotas foram purificadas das patas por gradiente de densidade utilizando o PercollTM (GE Healthcare – Sweden) a 40% e 90% (Ahmed et al. 2003; Lang et al. 2005).

4.7 Obtenção de extrato protéico total de *Leishmania*

Para a obtenção de extrato protéico total, as promastigotas ou amastigotas foram primeiramente lavadas com PBS e posteriormente contados em hemocítômetro. Em seguida, foram lisados com tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 2% SDS) acrescido de inibidores de protease no volume em μL determinado pela equação $[(\text{número de células}/2 \times 10^7) \times 5]$. O sedimento foi ressuspensão, fervido por 10 minutos e em seguida diluído em tampão de amostra (62,5 mM Tris pH 6,8; 2,5% SDS; 10% glicerol; 2,5% β -mercaptoetanol; 1% EDTA; 0,015% azul de bromofenol). Foram aplicados no gel 10 μL de cada amostra contendo 500ng de proteínas (BCATM protein Assay kit) por canaleta nos géis de poliacrilamida-SDS.

4.8 Eletroforese em SDS-PAGE

As amostras foram separadas em géis de poliacrilamida-SDS de 12% ou 15% (para proteínas de alto e baixo peso molecular, respectivamente) em cuba Mini-Protean (BioRad). As corridas foram realizadas a 100 V em tampão Tris-glicina pH 8,3 (25 mM Tris pH 8,3; 250 mM glicina; 0,1% SDS).

Como marcadores de peso molecular foram utilizados High Range e Low Range Markers (Gibco-BRL).

4.9 Western blot e Immunblotting utilizando quimioluminescência (ECL-HRP)

O Western blot foi realizado de acordo com Towbin et al. 1979 e Burnette 1981, com algumas modificações. As amostras de extrato protéico total dos parasitos foram fracionadas em poliacrilamida-SDS e transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond-ECL, Amersham-Pharmacia) através de transferência eletroforética semi-seca, em tampão de transferência (48 mM Tris-Base, 39 mM glicina; 0,0037% SDS, 20% metanol) no aparelho “Trans-Blot® SD-Semidry Transfer Cell” (BioRad) a 10 V, por 40 minutos. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com TBST-leite desnatado 5% (Tris 10mM pH8; NaCl 150mM; Tween 20, 0,1%; leite desnatado 5%) por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. As membranas, contendo as proteínas foram então incubadas com soro imune (anti-*LRR17*, anti-*META2*, anti-*STI1*, anti-*TSA* e anti-*GAPDH*) diluídos em 1:3000, 1:500, 1:400, 1:400 e 1:3000 respectivamente. As

membranas contendo as proteínas de amastigotas foram incubadas com soro imune (anti-*LRR17*, anti-*LbSTI*, anti-*TSA* e anti-*GAPDH*) diluídos em 1:3000, 1:500, 1:600 e 1:3000 respectivamente, em TBST com leite desnatado 1% por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação leve. A membrana foi lavada 3x com TBST por 10 minutos e incubada com soro anti-imunoglobulinas totais de camundongo ou coelho conjugado a “horseradish peroxidase” diluído 1:3000 em TBST por 1h a temperatura ambiente sob agitação leve. A membrana foi lavada 3x com TBST por 10 minutos e uma última vez com PBS 1%. A revelação foi feita com o kit “SuperSignal West Pico Trial” (PIERCE) e a exposição através de filmes de Raio X em diferentes tempos.

4.10 Avaliação da expressão de proteínas por citometria de fluxo

Os parasitos obtidos como descrito anteriormente foram lavados em PBS e 1×10^7 /parasitos ressuspensos em 250µL de tampão de FACS [do inglês *Fluorescence Activated Cell Sorting* (PBS contendo 3% de SBF e 0,05% azida sódica)]. Foram adicionados 250µL de paraformaldeído 4% aos lisados e mantidos à temperatura ambiente durante 15 minutos. Os parasitos foram lavados 2x com tampão de FACS, e ressuspensos em 500µl com este tampão. Foram adicionados 5µl de Saponina 15% e mantido a 4°C durante 15 minutos. Os parasitos foram lavados 2x com tampão de FACS, ressuspensos em 500µl e 50µl foram transferidos para cada tubo. Foram adicionados 2µl de anti-*TSA* biotinilado e mantido por 20 minutos à temperatura ambiente. Os parasitos foram então lavados 2x com tampão de FACS, ressuspensos em 50µl de tampão de FACS, e adicionado 3µl de estreptavidina conjugada a FITC (SEROTEC) previamente diluída 10X em tampão de FACS, que foi mantida por 20 minutos à temperatura ambiente. Esses parasitos foram novamente lavados 2x com tampão de FACS, ressuspensos para 200µl e levado ao citômetro de fluxo para a aquisição das amostras.

4.11 Análises estatísticas

Os resultados foram comparados quanto à significância dos mesmos através do teste *t* de Student's não pareado ou ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni (Análise de variância) através do programa Graph-Pad Prism Software 5.0 (Inc. San Diego, CA, USA). A quantificação da área das bandas protéicas dos isolados foi realizada

através do programa ImageJ 1.43 (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA). Os resultados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão (SD) como descrito em cada figura. O nível de significância foi estabelecido com o valor de $p < 0,05$ ou $p < 0,01$.

Os dados da citometria de fluxo foram adquiridos em software CFLOW (Accuri's®) e analisados no software FCS Express 4.0 (DE novo Software).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização dos pacientes

Neste estudo foram utilizados três *isolcut* (JCJ8c, RPL5c e SMB7c) e três *isol muc* (ASL9m, JBC8m e PPS6m).

Os pacientes foram caracterizados de acordo com o estado proveniente do paciente, a forma clínica, o número de lesões, o tipo de lesão, o tratamento e o resultado clínico. Essas informações estão descritas na tabela 1.

Os pacientes do estudo pertenciam aos estados de Goiás (n=02), do Pará (n=02), da Bahia (n=01) e do Tocantins (n = 01).

Apenas um paciente com a forma cutânea apresentou duas lesões com úlceras crostosas (RPL), dois outros pacientes, também com a forma cutânea, apresentaram apenas uma lesão cutânea ulcerada (JCJ, SMB). O paciente SMB também apresentou uma lesão mucosa ulcerada eritemato-edematosa, porém o parasito utilizado no estudo foi isolado da lesão cutânea. Dois pacientes com a forma mucosa apresentaram úlcera nasal (PPS e JBC), sendo que o último apresentou também uma lesão no palato. O outro paciente com a forma mucosa apresentou lesão ulcerada eritemato-edematosa, infiltração e perfuração nasal (ASL).

Em relação ao tratamento, apenas um paciente não retornou após o diagnóstico, portanto não recebeu o tratamento no Hospital de Doenças Tropicais (HDT) (PPS). Os outros cinco pacientes (JBC, JCJ, ASL, RPL e SMB) foram tratados com Glucantime®, sendo que quatro deles evoluíram para a cura clínica. O paciente JBC foi atendido após recidiva das lesões e tratado com Pentoxifilina e Glucantime®, apresentando cura após três meses de tratamento (Figura 2).

Tabela 1 - Caracterização dos isolados no estudo

<i>Isolado</i>	<i>Espécie</i>	<i>Estado</i>	<i>Forma clínica</i>	<i>Número de lesões</i>	<i>Tipo de lesão</i>	<i>Tratamento</i>	<i>Resultado clínico</i>
RPL5c	<i>L.(V.)b</i>	PA	LC	2	Úlcero- crostosa	Glucantime	Cura clínica
PPS6m	<i>L.(V.)b</i>	BA	LM	-	Úlcera nasal	ST	NR
JBC8m	<i>L.(V.)b</i>	GO	LM	-	Úlcera nasal e lesão no palato	Glucantime Pentoxifilina	Retornos das lesões e cura clínica
ASL9m	<i>L.(V.)b</i>	GO	LM	-	Ulcerada, eritemato- edematosa, infiltração perfuração nasal	Glucantime	Cura clínica
JCJ8c	<i>L.(V.)b</i>	PA	LC	1	Ulcerada	Glucantime	Cura clínica
SMB7c	<i>L.(V.)b</i>	TO	LC	1 (cut) e lesão na mucosa nasal	Ulcerada (cut) Mucosa ulcerada eritemato- edematosa	Glucantime	Cura clínica

L(V)b= *Leishmania (Viannia) braziliensis*; LC= Leishmaniose Cutânea; LM= Leishmaniose Mucosa; ST= Sem Tratamento; NR= Não Retornou

5.2 Curvas de crescimento *in vitro* dos parasitos de *L.(V.) braziliensis*

A fim de avaliar se os diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis* utilizados no estudo possuem um mesmo padrão de crescimento em cultura, foi avaliada a cinética de crescimento *in vitro* de parasitos recém isolados da pata de camundongos IFN γ KO. A cultura foi iniciada com 1×10^6 parasitos/mL e a cinética do crescimento foi obtida através da contagem diária em citômetro de fluxo durante dez dias.

A comparação entre os isolados mostrou que todos os isolados, no sexto dia de cultura, se encontravam em fase estacionária de crescimento. No décimo de cultura observa-se que os isolados mantiveram um padrão de crescimento lento, característico da fase estacionária. O isolado ASL9m e o JBC8m foram os únicos que obtiveram um decréscimo do número de parasitos a partir do oitavo dia de cultura. Não foi observado diferenças quanto a uma melhor adaptação em cultura entre os *isolcut* e *isalmuc*, visto que independente da lesão a qual foi obtido os isolados, estes demonstraram padrão similar de crescimento (Figura 2).

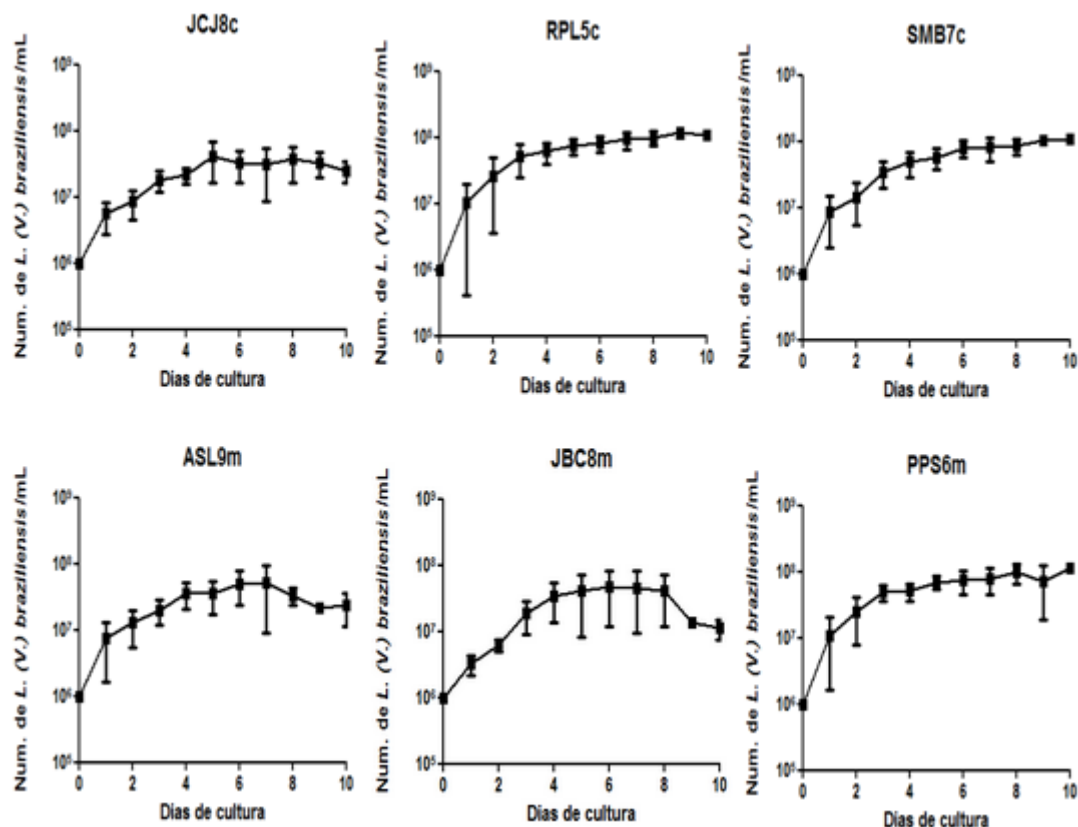


Figura 2 - Curva de crescimento *in vitro* de *L. (V.) braziliensis*. Formas promastigotas de 3 *isolcut* (JCJ8c, RPL5c e SMB7c) e de 3 *isolmuc* (ASL9m, JBC8m e PPS6m) foram cultivadas em meio de Grace na concentração inicial de 1×10^6 parasitos/mL a 26°C. Os parasitos foram quantificados em citômetro de fluxo durante 10 dias. Os resultados representam a média do número de parasitos por mL $\pm$ SD de três experimentos independentes.

5.3 Detecção da proteína META2 em extratos protéicos totais de promastigotas em fase estacionária de *L (V.) braziliensis* oriundas de pacientes com lesão cutânea ou mucosa

Para avaliar a expressão de diferentes proteínas nas diferentes formas dos isolados estudados, os parasitos foram obtidos como descrito em materiais e métodos e lisados para que a expressão das diferentes proteínas fosse quantificada através do *immunoblotting*.

Na figura 3A e 3B está representado o *blot* de um experimento representativo e a média da expressão da proteína META2, respectivamente, obtida em três *immunoblottings* de *isolcut* e *isolmuc*. Foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão da proteína entre os dois grupos analisados, porém alguns dos isolados expressaram uma maior quantidade de META2 que os demais.

Os isolados SMB7c e JBC8m foram os que expressaram a maior quantidade da proteína apresentando área=1,5 (a^2) e os isolados JCJ8c e ASL9m os que expressaram a menor quantidade (Área=0,8 e Área =1,0, respectivamente), mostrando assim, uma distribuição homogênea desta proteína entre os grupos.

Apesar de não ter sido observada diferença significativa entre os dois grupos, quando os isolados foram comparados independente do grupo a que pertenciam (Fig. 3C) observou-se que a expressão de META2 no *isolcut* SMB7c foi significantemente maior que nos isolados JCJ8c ($p<0,01$) e RPL5c ($p<0,05$). Entre os *isolmuc*, a expressão da proteína no isolado PPS6m foi maior que no isolado JCJ8c ($p<0,05$). A expressão da proteína foi maior também no isolado JBC8m comparado com os isolados JCJ8c ($p<0,01$), RPL5c ($p<0,05$) e ASL9m ($p<0,05$).

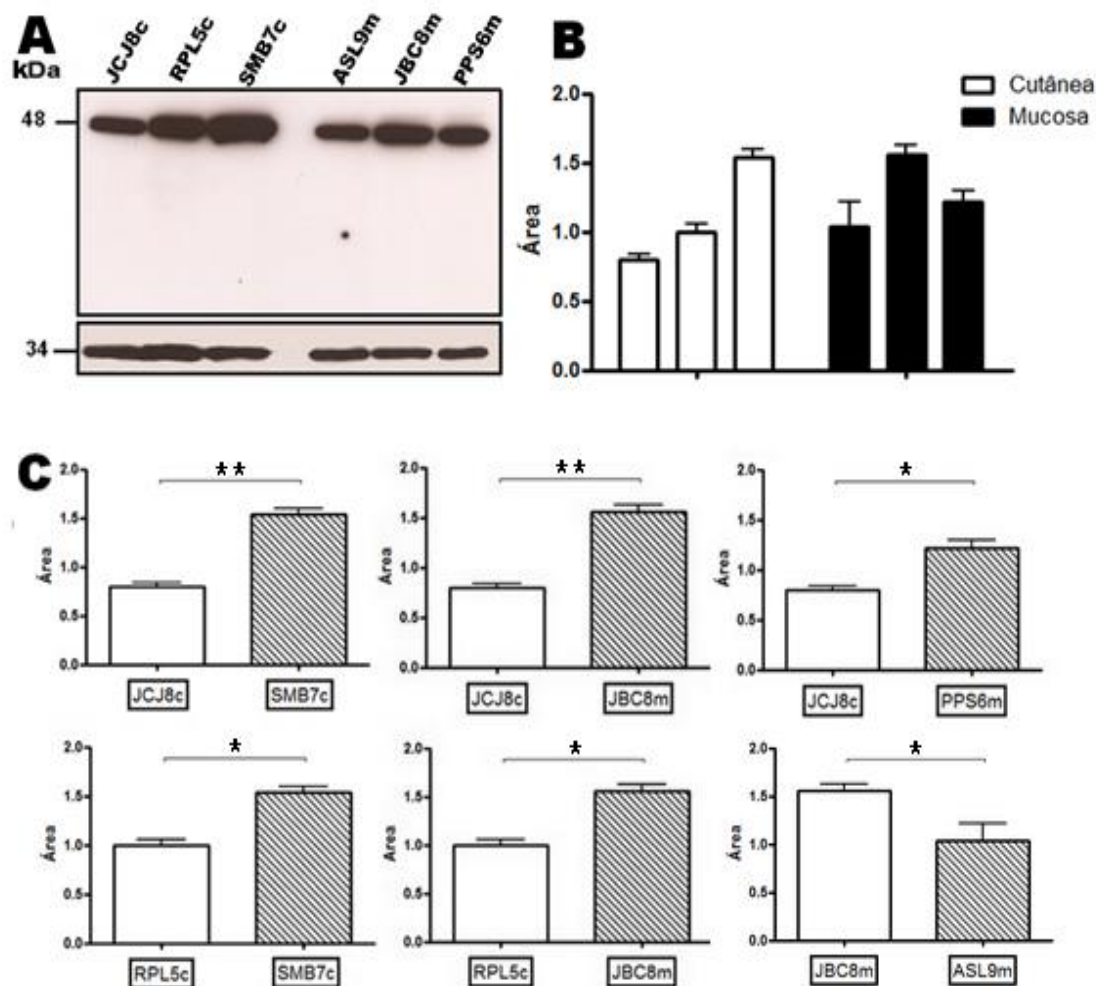


Figura 3 - Expressão da proteína META2 em extratos proteicos totais de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Proteínas totais obtidas do lisado de promastigotas em fase estacionária de *isolcut* (JCJ8c, RPL5c e SMB7c) e *isolmuc* (ASL9m, JBC8m e PPS6m) foram fracionadas em géis de poliacrilamida-SDS, transferidas para membranas de nitrocelulose e tratadas com antisoro α -META2. Os *immunoblottings* foram visualizados através de quimioluminescência. **A**, Blot da expressão da proteína META2 e da proteína normalizadora GAPDH nos *isolcut* e *isolmuc* representados através de bandas de 48 e 34 kDa, respectivamente. **B**, Média da expressão da proteína META2 entre os grupos e $\pm$ SD de três experimentos independentes. **C**, Média da expressão da proteína META2 entre os isolados e $\pm$ SD de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.4 Detecção da proteína LRR17 em extratos protéicos totais de promastigotas em fase estacionária e amastigotas de *L (V.) braziliensis* oriundas de pacientes com lesão cutânea ou mucosa

A expressão da proteína LRR17 em promastigotas em fase estacionárias (Fig. 4A e 4B) ou amastigotas (Fig. 4C e 4D) não foi significativamente diferente entre os dois grupos analisados, porém nas promastigotas em fase estacionária (Fig. 4B) observou-se uma menor expressão de LRR17 no isolado PPS6m (Área =0,8) em relação aos demais. Entre as amastigotas (Fig. 4C), o isolado SMB7c se destacou entre os outros isolados na expressão da proteína (Área =0,9).

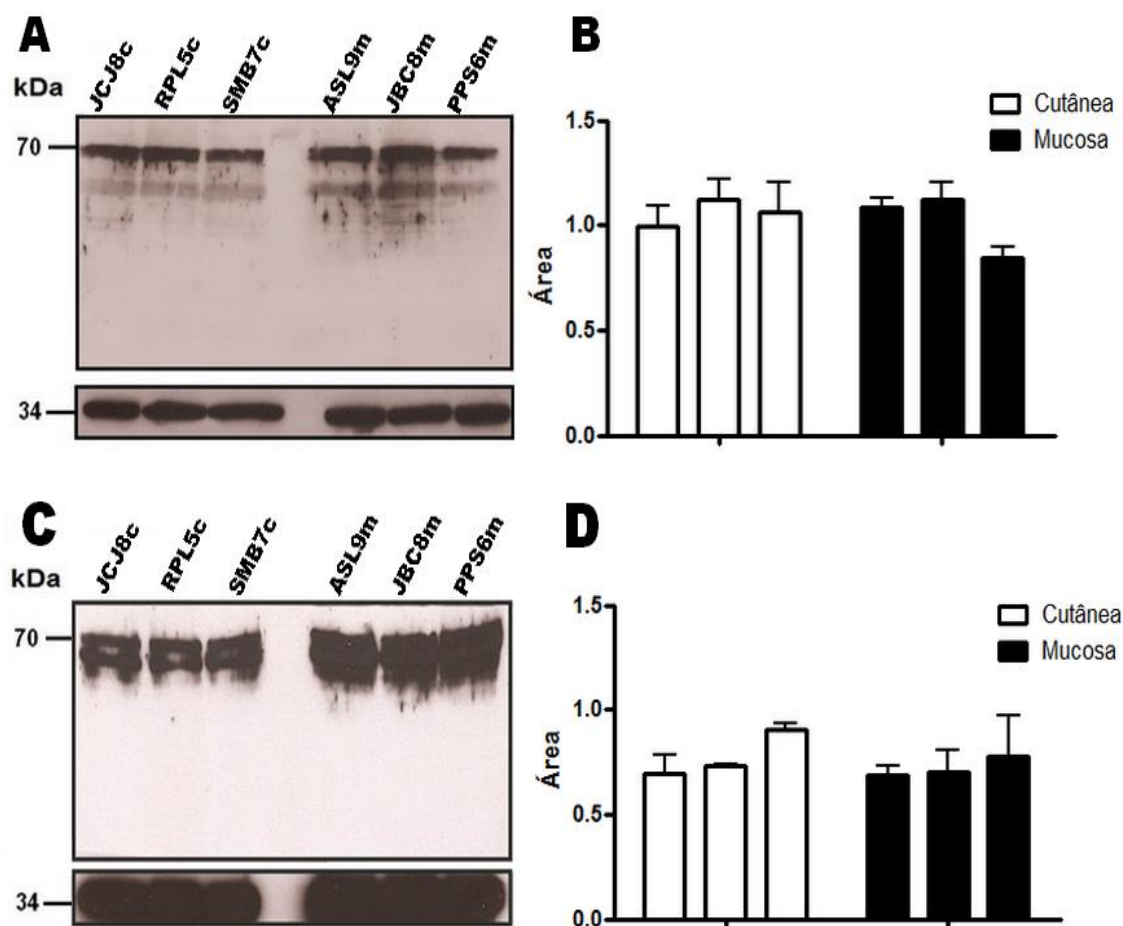


Figura 4 - Expressão da proteína LRR17 em extratos protéicos totais de promastigotas e amastigotas *L. (V.) braziliensis*. Proteínas totais obtidas do lisado de promastigotas em fase estacionária e de amastigotas obtidas de lesão de camundongos IFN γ KO de *isolcut* (JCJ8c, RPL5c e SMB7c) e *isolmuc* (ASL9m, JBC8m e PPS6m) foram fracionadas em géis de poliacrilamida-SDS, transferidas para membranas de nitrocelulose e tratadas com antisoro α -LRR17. Os *immunoblottings* foram visualizados através de quimioluminescência. **A e C**, Blot da expressão da proteína LRR17 e da proteína normalizadora GAPDH nos *isolcut* e *isolmuc* representados através de bandas de 70 e 34 kDa, respectivamente. **B e D**, Média da expressão da proteína LRR17 entre os grupos e $\pm$ SD de três experimentos independentes. **A e B**, promastigotas em fase estacionária e **C e D**, amastigotas. * $p < 0,05$.

5.5 Detecção da proteína STI1 em extratos protéicos totais de promastigotas em fase estacionária e amastigotas de *L (V.) braziliensis* oriundas de pacientes com lesão cutânea ou mucosa

A diferença na expressão da proteína STI1 em promastigotas em fase estacionária (Fig. 5A e 5B), bem como em amastigotas (Fig. 5C e 5D) não foi significativa. As formas promastigotas dos isolados RPL5c e ASL9m, expressaram a maior quantidade de proteína (Área = 0,8). Entre as amastigotas, pode ser observado que o isolado JCJ8c foi o que expressou mais proteína (Área = 1,6) (Fig. 5B). A expressão da proteína nos demais isolados, em ambas as formas do parasito foi semelhante. Foi realizada também a análise da expressão da proteína entre os isolados, porém não se observou diferença significativa entre eles (dados não mostrados).

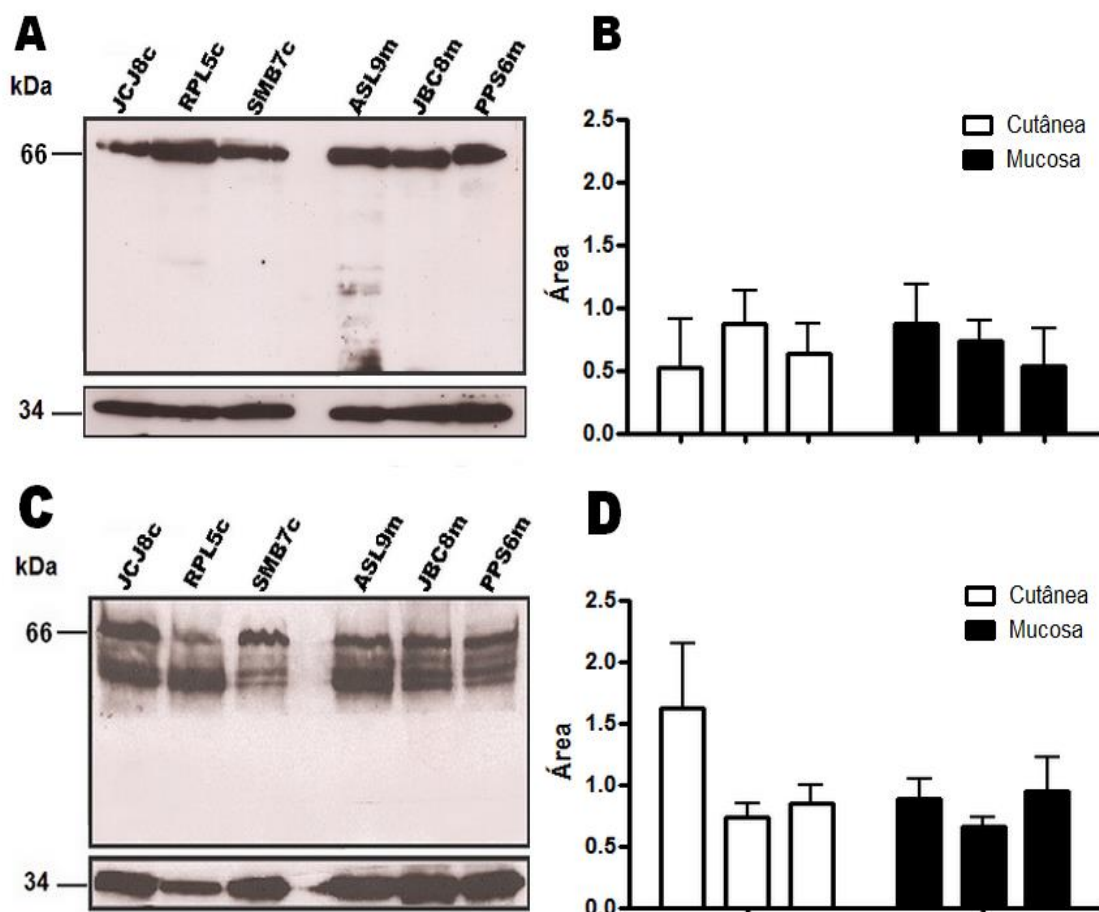


Figura 5 - Expressão da proteína STI1 em extratos protéicos totais de promastigotas e amastigotas *L. (V.) braziliensis*. Proteínas totais obtidas do lisado de promastigotas em fase estacionária e de amastigotas obtidas de lesão de camundongos IFN γ KO de *isolcut* (JCJ8c, RPL5c e SMB7c) e *isolmuc* (ASL9m, JBC8m e PPS6m) foram fracionadas em géis de poliacrilamida-SDS, transferidas para membranas de nitrocelulose e tratadas com antisoro α -STI1. Os *immunoblottings* foram visualizados através de quimioluminescência. **A e C**, Expressão da proteína STI1 e da proteína normalizadora GAPDH nos *isolcut* e *isolmuc* representados através de bandas de 66 e 34 kDa, respectivamente. **B e D**, Média da expressão da proteína STI1 entre os grupos e $\pm$ SD de três experimentos independentes. **A e B**, promastigotas em fase estacionária e **C e D**, amastigotas. * $p < 0,05$.

5.6 Detecção da proteína TSA em extratos protéicos totais de promastigotas e amastigotas de *L (V.) braziliensis* oriundas de pacientes com lesão cutânea ou mucosa

Ao contrário do observado para as outras proteínas analisadas, a expressão de TSA em formas promastigotas em fase estacionária foi estatisticamente maior ($p = 0,04$) nos *isolmuc* quando comparado com *isolcut* (Fig. 6B).

Na Figura 6B nota-se que o JBC8m e o PPS6m foram os isolados que apresentaram a maior expressão da proteína (Área=1,42 e Área =1,45, respectivamente).

A Figura 6C demonstra que a expressão da proteína nesses dois *isolmuc* (JBC8m e PPS6m) foram estatisticamente maior que no isolado JCJ8c (JBC8m x JCJ8c, $p<0,01$; PPS6m x JCJ8c, $p<0,05$) e que no isolado SMB7c (JBC8m x SMB7c, $p<0,01$; PPS6m x SMB7c, $p<0,05$).

Não foi observada diferença estatística na expressão da proteína em amastigotas entre os dois grupos (Fig. 7B).

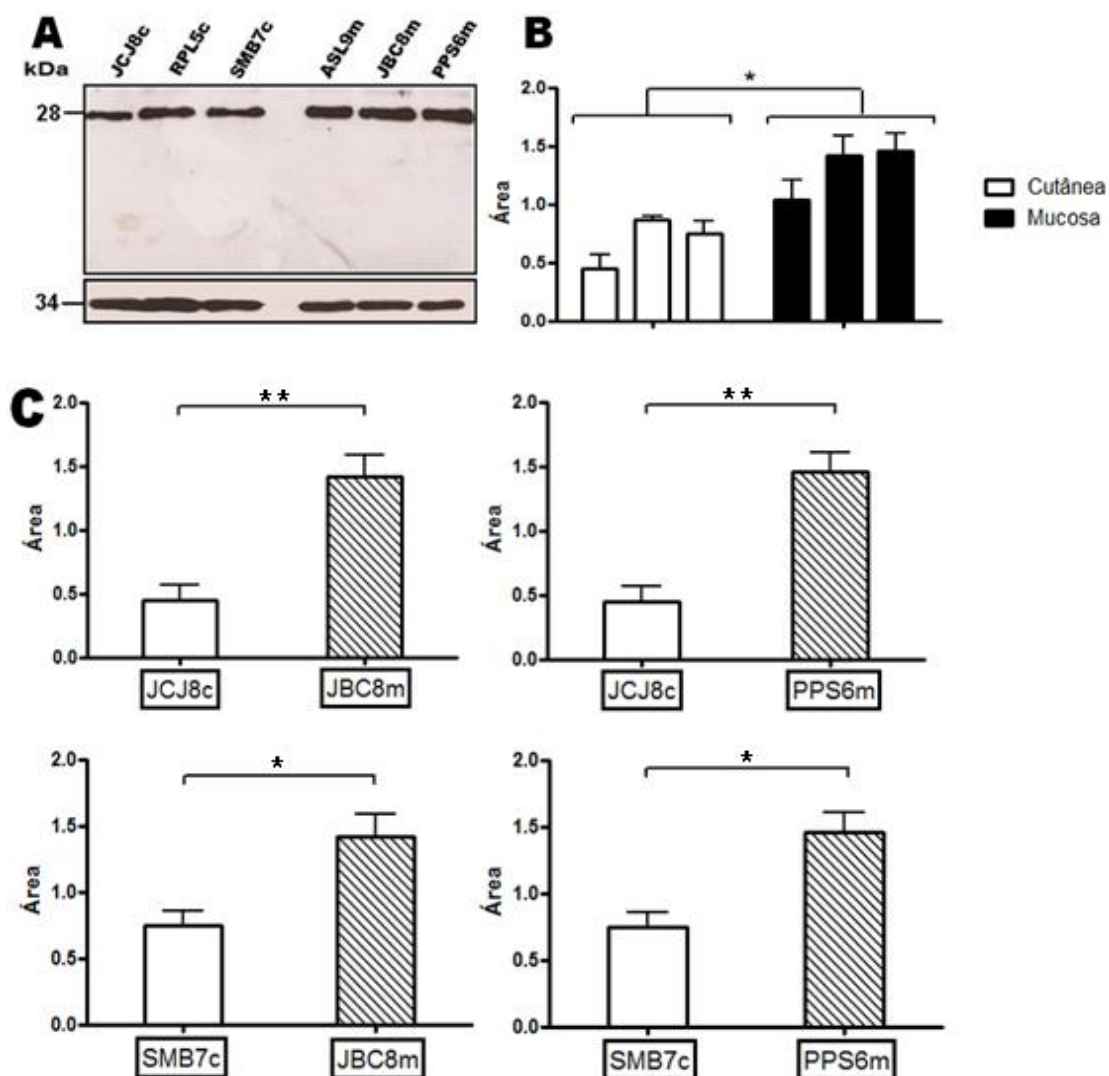


Figura 6 - Expressão da proteína TSA em extratos proteicos totais de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Proteínas totais obtidas do lisado de promastigotas em fase estacionária de *isolcut* (JCJ8c, RPL5c e SMB7c) e *isolmuc* (ASL9m, JBC8m e PPS6m) foram fracionadas em géis de poliacrilamida-SDS, transferidas para membranas de nitrocelulose e tratadas com antisoro α -TSA. Os *immunoblottings* foram visualizados através de quimioluminescência. **A**, Expressão da proteína TSA e da proteína normalizadora GAPDH nos *isolcut* e *isolmuc* representados através de bandas de 28 e 34 kDa, respectivamente. **B**, Média da expressão da proteína TSA entre os grupos e $\pm$ SD de três experimentos independentes. **C**, Média da expressão da proteína TSA entre os isolados e $\pm$ SD de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

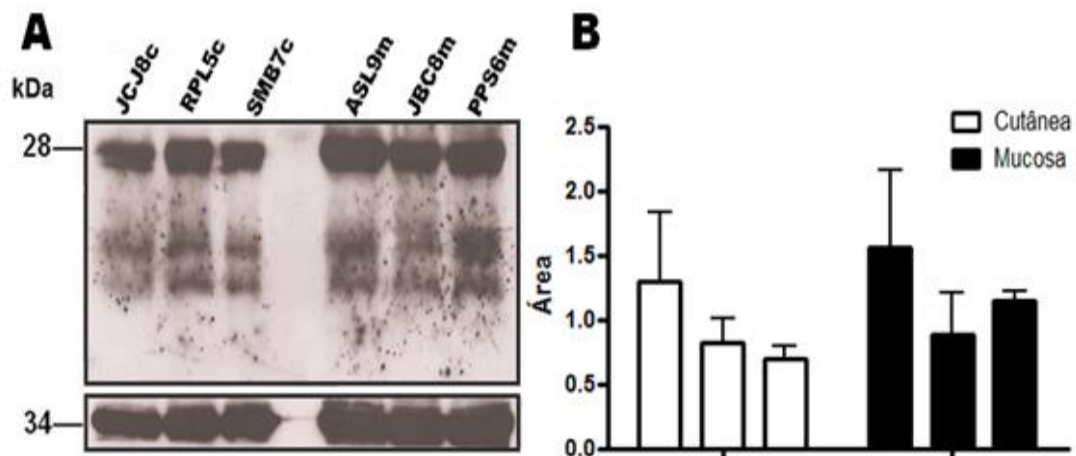


Figura 7 - Expressão da proteína TSA em extratos proteicos totais de amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Proteínas totais obtidas do lisado de amastigotas obtidas de lesão de camundongos IFN γ KO de *isolcut* (JCJ8c, RPL5c e SMB7c) e *isalmuc* (ASL9m, JBC8m e PPS6m) foram fracionadas em géis de poliacrilamida-SDS, transferidas para membranas de nitrocelulose e tratadas com antisoro α -TSA. Os *immunoblottings* foram visualizados através de quimioluminescência. **A**, Expressão da proteína TSA e da proteína normalizadora GAPDH nos *isolcut* e *isalmuc* representados através de bandas de 28 e 34 kDa, respectivamente. **B**, Média da expressão da proteína TSA entre os grupos e $\pm$ SD de três experimentos independentes. * $p < 0,05$.

Para confirmar a diferença observada entre os grupos de *isolcut* e *isolmuc* pela técnica de *immunoblotting*, a expressão de TSA foi analisada também por citometria de fluxo.

Na figura 8A está representado um histograma representativo de três análises de citometria de fluxo. Na figura 8B, 8C e 8D estão representados a média da porcentagem de células positivas para TSA, a média aritmética da intensidade de fluorescência de TSA e o produto da média da porcentagem de células positivas para TSA vezes a média aritmética da intensidade de fluorescência, respectivamente.

Na Figura 8B não foi observada diferença significativa na média da porcentagem de células positivas para TSA entre os grupos de *isolcut* e *isolmuc*. Porém, na Figura 8C, a média aritmética da intensidade de fluorescência da proteína nas células foi significativamente maior nos *isolmuc* comparado com os *isolcut*. Essa diferença foi observada também quando analisado o produto da média da porcentagem de células positivas vezes a média aritmética da intensidade de fluorescência (Fig.8D). A média aritmética da intensidade de fluorescência da proteína e o produto da média da porcentagem de células positivas vezes média aritmética da intensidade de fluorescência entre os isolados foi maior em PPS6m ($2199,5 \pm 323,7$ e $8963,83 \pm 1586,2$; respectivamente).

Nas promastigotas em fase logarítmica não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (dados não mostrados). Em promastigotas em fase estacionárias, ao contrário do que foi observado em amastigotas, foi visto diferença significativa entre os grupos em relação a porcentagem de células positivas para TSA (Fig. 9B). No entanto, quando analisada a intensidade de fluorescência da proteína nas células, não foi observada essa diferença (Fig.9C). Entre os grupos, foi também significativo o produto da média da porcentagem de células positivas vezes média aritmética da intensidade de fluorescência. O isolado JBC8m foi o que apresentou a maior porcentagem de células positivas para TSA e o maior produto da média da porcentagem de células positivas vezes média aritmética da intensidade de fluorescência ($63,9 \pm 11,5$ e $147283,8 \pm 1585,2$) (Fig. 9D).

A

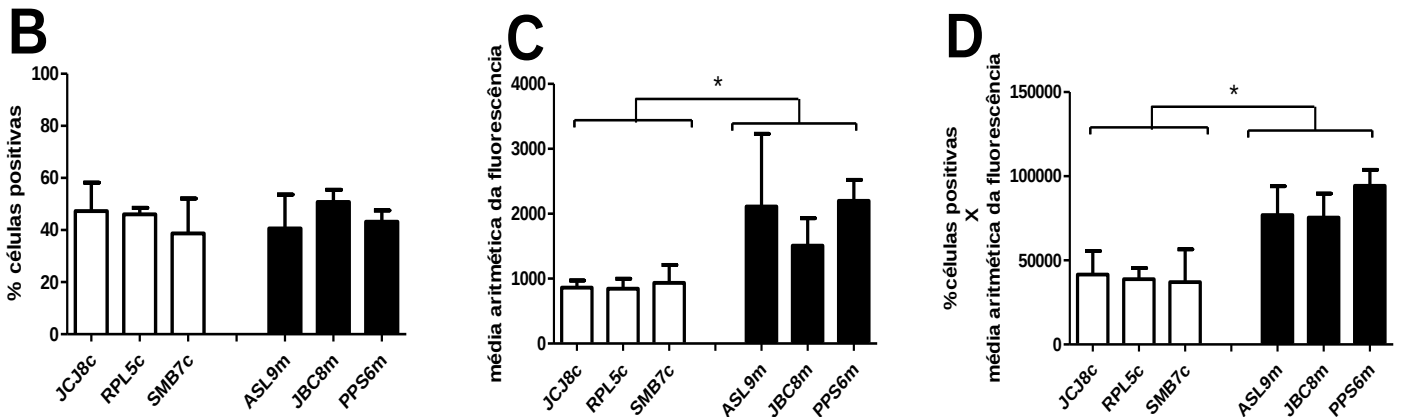
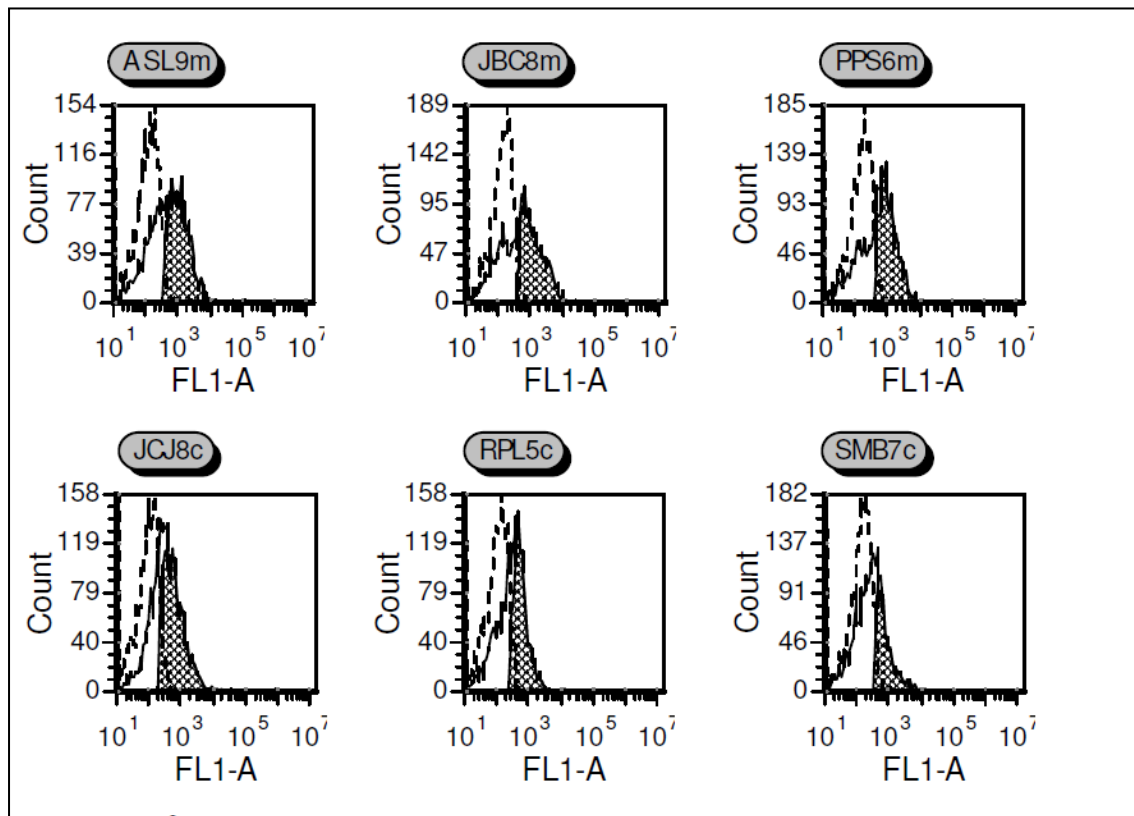
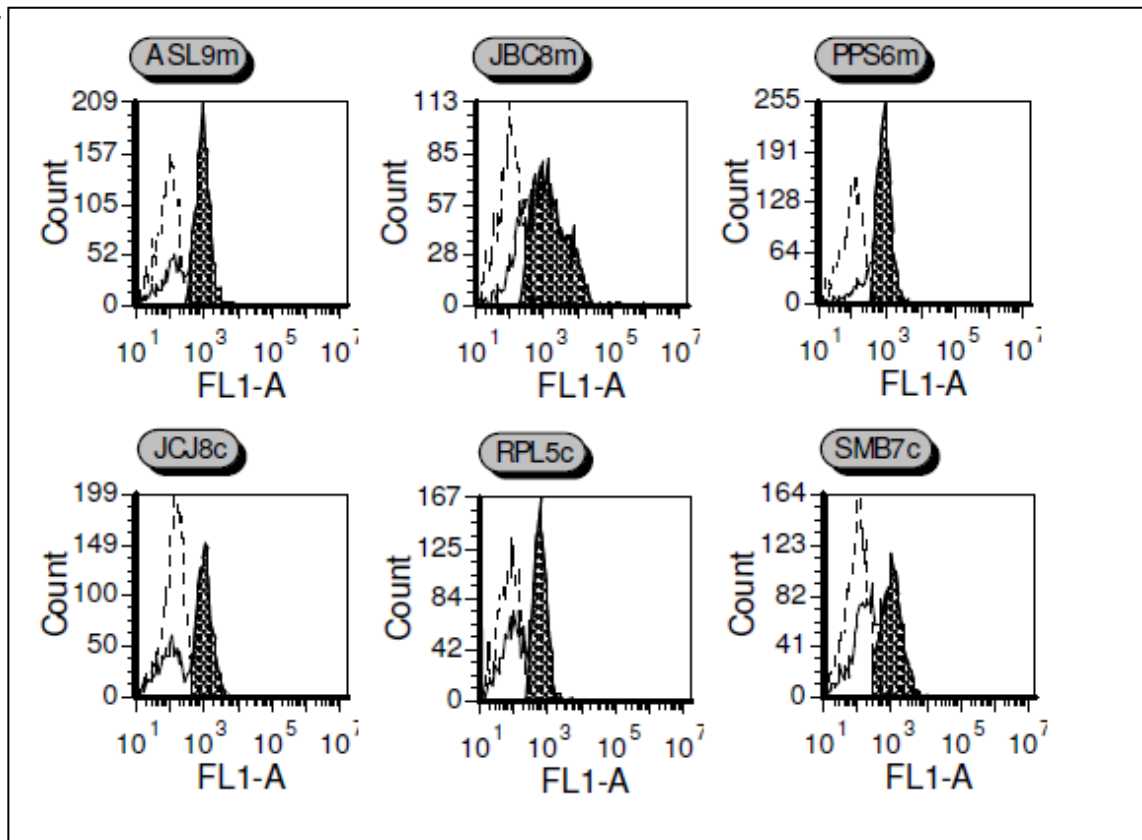
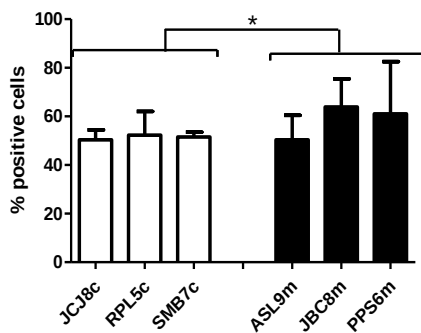


Figura 8 - Expressão de TSA por promastigotas em fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* através de citometria de fluxo. *Isolcut* (JCJ8c, RPL5c e SMB7c) e *isolmuc* (ASL9m, JBC8m e PPS6m) foram cultivados em meio Grace's completo e no oitavo dia analisado para a expressão de TSA através da análise citométrica. Em A, está representado o histograma da expressão de TSA. Parasitos foram marcados com isotipo controle (linha pontilhada) ou anti-TSA (linha contínua). A zona sombreada representa a subtração do histograma das células positivas pelo isotipo controle. A % de células positivas (B), média de fluorescência (C) e o produto da % de células positivas x média de fluorescência (D) estão representadas através da média $\pm$ DP de três experimentos. * indica a diferença estatística entre os *isolcut* e *isolmuc* ($p < 0,05$, teste *t* de student's não pareado com correlação de Welch's).

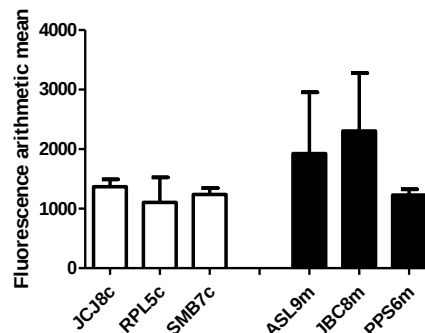
A



B



C



D

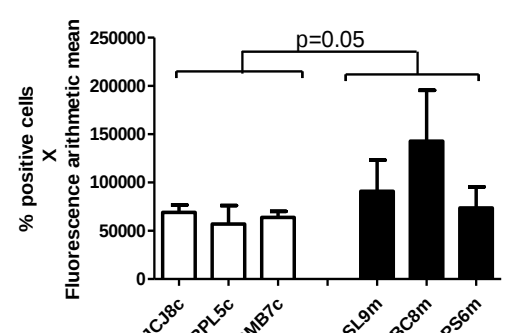


Figura 9 - Expressão de TSA por amastigotas de *L. (V.) braziliensis* através de citometria de fluxo. *Isolcut* (JCJ8c, RPL5c e SMB7c) e *isol muc* (ASL9m, JBC8m e PPS6m) foram inoculados em camundongos IFN- γ KO para obtenção de amastigotas as quais foram analisadas para expressão de TSA através da análise citométrica. Em A, está representado o histograma da expressão de TSA. Parasitos foram marcados com isotipo controle (linha pontilhada) ou anti-TSA (linha contínua). A zona sombreada representa a subtração do histograma das células positivas pelo isotipo controle. A % de células positivas (B), média de fluorescência (C) e o produto da % de células positivas x média de fluorescência (D) estão representadas através da média $\pm$ DP de três

experimentos. * indica a diferença estatística entre os *isolcut* e *isolmuc* ($p < 0,05$, teste *t* de student's não pareado com correlação de Welch's).

6. DISCUSSÃO

A *L. (V.) braziliensis* é a principal espécie causadora da LT no Brasil e a responsável pela forma clínica mais destrutiva da doença, a LM. Os parâmetros que permitem prever se lesões mucosas irão aparecer em indivíduos infectados com *L. (V.) braziliensis* são pouco conhecidos. Porém, existem alguns fatores inerentes ao parasito, como proteínas associadas à virulência, que podem ser uma das causas para a maior sobrevida das leishmânias promovendo um aumento das chances de gerar metástases nas mucosas.

Neste estudo foi mostrado que promastigotas de *isolmuc* em fase estacionária expressam mais TSA que os *isolcut*. Esta maior expressão de TSA foi observada através de duas técnicas, *immunoblotting* e citometria de fluxo. Nas formas amastigotas, por sua vez, não foi observada diferença estatística entre os *isolcut* e *isolmuc* pela técnica de *immunoblotting*, embora a expressão tenha sido aparentemente maior nos *isolmuc*. Por outro lado, o número de leishmânias positivas para TSA foi significativamente maior nos *isolmuc*. A proteína TSA, além de ser uma das candidatas a vacina de subunidade contra a leishmaniose por induzir uma resposta protetora em modelos infectados com *Leishmania* (Campos-Neto et al. 2001; Campos-Neto et al. 2002; Coler et al. 2002), foi também mostrada estar relacionada com a virulência do parasito (Chae et al. 1994). Esta é uma proteína antioxidante que foi primeiramente isolada de *S. cerevisiae* e protegeu esta levedura contra danos oxidativos mediado pela redução do H_2O_2 (Chae et al. 1994).

Na leishmaniose, o NO e O_2^- são as principais moléculas microbicidas envolvidas na defesa contra parasitos. Essas moléculas podem dar origem também a outros metabólitos, tais como H_2O_2 e o $ONOO^-$, que são ainda mais tóxicos para a leishmânia que esses produtos iniciais (Haidaris & Bonventre 1982; Linares et al. 2001; Van Assche et al. 2011). Os macrófagos, após o reconhecimento de *Leishmania* se tornam ativados e capazes de desempenhar o papel de células efectoras os quais fagocitam e matam esses microorganismos no fagolisossomo através dessas moléculas microbicidas (Van Assche et al. 2011). No entanto, parasitos como as leishmânias adquiriram várias estratégias as quais permitem que escapem desses mecanismos, promovendo a infecção (Genestra et al. 2006). Uma dessas estratégias é a produção de

enzimas antioxidantes, tais como a TSA descrita neste trabalho e a superóxido dismutase, catalase e outras peroxidases as quais regulam ou eliminam o O_2^- e o H_2O_2 (Alphey et al. 2000).

Entre as proteínas analisadas, a TSA foi a única cuja expressão foi significativamente diferente entre os grupos *isocult* e *isolmuc* e por isso foram utilizadas as técnicas de *immunoblotting* e citometria para avaliar sua expressão. A análise citométrica constitui do mesmo princípio do *immunoblotting*, que é a detecção de proteínas através de ligações antígeno-anticorpo. No entanto, nesta primeira os anticorpos são marcados com um fluorocromo e analisados através do citômetro de fluxo. No *immunoblotting* a detecção das proteínas é realizada através da degradação de um substrato quimioluminescente por uma enzima conjugada a um anticorpo. A análise citométrica foi utilizada a fim de confirmar o resultado obtido anteriormente com o *immunoblotting* pelo fato de ser uma técnica mais precisa e mais quantitativa (Sambrook et al. 1989; Givan 2011). Na análise por *immunoblotting* foi possível avaliar a expressão da proteína total pelas leishmânias, sendo que na citometria de fluxo foi possível avaliar o número de leishmânias que expressam a proteína, o aumento da proteína pelas leishmânias ou ambos. No presente estudo foi visto que na citometria de fluxo que, *isolmuc* em fase estacionária tiveram uma maior expressão de TSA pelas leishmânias, diferente do observado para as amastigotas dos *isolmuc*, onde a maior expressão observada foi na porcentagem de células.

Nos resultados aqui apresentados pudemos notar que *isolmuc* expressam mais proteína TSA e essa expressão é maior em promastigotas e amastigotas que constituem as formas infectantes dos parasitos. Apesar de não ser tão notável a diferença na expressão de TSA nas diferentes fases do parasito, foi possível confirmar, em duas técnicas, que TSA é mais expresso nos *isolmuc*. A maior expressão da TSA em promastigotas em fase estacionária de *isolmuc* não se deve ao fato desses isolados terem uma melhor ou pior adaptação na cultura, visto que através da cinética de crescimento, foi possível notar que todos os isolados apresentaram crescimento similar.

A maior expressão de TSA em *isolmuc* está de acordo com outros trabalhos que demonstram que estes isolados possuem mecanismos de escape adicionais aos *isolcut*. Foi o demonstrado por Leite et al. 2012, que isolados de lesão mucosa apresentavam uma maior atividade da enzima ecto-nucleotidase, a qual apresenta potencial anti-inflamatório, do que isolados de lesão cutânea. Foi demonstrado também neste estudo, que camundongos infectados com o isolado de lesão mucosa PPS6m, o qual expressava

grande quantidade desta enzima, apresentaram uma carga parasitária maior e mais persistente comparada com os camundongos infectados com o isolado de lesão cutânea SSFc. Além disso, viu-se também que a porcentagem de macrófagos infectados *in vitro* com SSFc, 72 horas após ativação com IFN- γ e LPS foi significativamente reduzida, não sendo observado o mesmo para o PPS6m (Leite et al. 2012). Em outro trabalho, foi visto o papel da enzima arginase, onde foi demonstrado que isolados de pacientes com LM possuíam uma maior atividade desta enzima comparada com isolados de pacientes com LC e LDis, sugerindo que a alta atividade desta enzima pode contribuir para a sobrevivência e proliferação das leishmânias no ambiente hostil do macrófago (Vendrame et al. 2010). Giudice et al. 2007, por sua vez, mostrou através de experimentos *in vitro* que isolados de *L. (V.) braziliensis* resistentes ao NO, sobrevivem e multiplicam-se mais que os isolados não resistentes ao NO, sugerindo que essa resistência pode beneficiar as leishmânias no macrófago, possibilitando a exacerbação da doença (Giudice et al. 2007). Outros estudos apontam que o Leishmania RNA Vírus (LRV1) identificado em alguns isolados de *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* poderia estar associado com a susceptibilidade à doença (Ives et al. 2011).

Neste estudo foi visto também a expressão da proteína META2 em promastigotas em fase estacionária. O resultado observado foi de que sua expressão não foi diferente entre os grupos de *isolcut* e *isolmuc*, apesar de notar uma variação na expressão entre os diferentes isolados. A META2 é uma proteína estágio-regulada, sendo expressa principalmente em formas promastigotas em fase estacionária (Ramos et al. 2011). Muitos estudos têm sido realizados com outra proteína relacionada, a META1, mostrando em experimentos *in vivo* com *L. (L.) amazonensis* que a super expressão do gene gerou parasitos mais virulentos (Uliana et al. 1999). Baseado nas similaridades entre os dois genes, META1 e META2, sugeriu-se que este último poderia também estar envolvido na virulência do parasito, sendo demonstrado mais tarde o seu papel de proteção contra o estresse oxidativo e o choque térmico em *L. (V.) amazonensis* (Ramos et al. 2011). A expressão da proteína META2 foi significativamente maior no isolado SMB7c comparada com os isolados JCJ8c e RPL5c. No isolado JBC8m, por sua vez, a expressão de META2 foi significativamente maior comparada com os isolados JCJ8c, RPL5c e ASL9m. Esses resultados mostraram que, a maior expressão da proteína independe da lesão (cutânea ou mucosa) da qual foi adquirido o isolado. Porém, é importante notar que o isolado SMB7c, apesar de ser de

ser oriundo de lesão cutânea, o paciente apresentou também uma lesão na mucosa nasal e no isolado JBC8m o paciente apresentou a lesão mucosa e apresentou uma recidiva.

Franco 2008 encontrou nas proximidades dos genes META1 e META2 a proteína LRR17, a qual contém na sua região central seis repetições ricas em leucina (LRR). Os LRRs estão envolvidos na transdução de sinal, reconhecimento de patógeno e interações proteína-proteína (Kobe & Deisenhofer 1995; Girardin et al. 2002). Patógenos tais como bactérias e parasitos parecem utilizar esses LRRs para invadir a célula do hospedeiro e/ou suprimir sua resposta imune (Kedzierski et al. 2004b).

No presente estudo, foi visto que não houve diferença na expressão da proteína LRR17 entre os *isolcut* e *isolmuc* em formas promastigotas em fase estacionária e em amastigotas. Em bactérias, o estudo de proteínas que contém LRRs está melhor caracterizado que em *Leishmania*. Foi visto em *Listeria monocytogenes* que as internalinas possuem LRRs os quais foram implicados na invasão das células do hospedeiro mamífero (Marino et al. 2000). Na leishmânia, foi identificado LRR no PPG e antígeno de superfície (PSA-2), sendo que neste último, o domínio LRR foi envolvido na ligação da leishmânia ao macrófago através do receptor de complemento 3 (CR3) (Kedzierski et al. 2004a).

Vacinas compostas de antígenos que induzem uma resposta imune protetora têm sido importantes alvos de pesquisa para o tratamento da leishmaniose. Apesar da existência de tratamentos com quimioterápicos, estes possuem várias limitações como custo elevado, efeitos colaterais diversos, tratamento doloroso, além da toxicidade que possui o medicamento (Groggl et al. 1992; Coler et al. 2002; Rojas et al. 2006).

Dentre os antígenos candidatos a vacinas de subunidades estão às proteínas TSA e STI1, que em estudos com *L. (L.) major* conferiram proteção tanto em camundongos suscetíveis (BALB/c) como em primatas não humanos (macacos *Rhesus*) através da polarização da resposta imunológica para uma resposta th1 (Campos-Neto et al. 2001; Mendez et al. 2001; Campos-Neto et al. 2002; Salay et al. 2007). Em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major*, a STI1 induziu uma resposta mista Th1 e Th2, a qual não foi capaz de controlar a infecção (Webb et al. 1996).

Nos experimentos realizados com STI1 foi observado que a expressão da proteína não foi estatisticamente diferente entre os *isolcut* e *isolmuc* para ambas as formas, promastigotas em fase estacionária e amastigotas. Algumas proteínas de choque térmico foram vistas ser potentes indutoras de uma resposta Th1, podendo funcionar como o segundo sinal de ativação das células T (Segal et al. 2006).

Através dos resultados obtidos neste trabalho foi possível observar, como em outros trabalhos, que as leishmânias expressam proteínas as quais poderiam atuar aumentando a sua sobrevivência no interior dos macrófagos. A expressão de uma proteína como META2, por exemplo, que está envolvida na proteção do parasito contra o estresse oxidativo e que também possui regulação durante a metaciclologênese sugere que os parasitos que expressam mais da proteína se sobressaíam aos demais após o contato inicial com os mecanismos de morte do macrófago, tornando-os assim, mais resistentes e fazendo com que eles persistam no fagolisossomo e promova uma doença mais grave como a LM.

Em relação a proteína LRR17, que é uma proteína associada à virulência do parasito, a qual foi expressa similarmente entre os grupos de *isolcut* e *isalmuc*, sugere que uma proteína que é expressa constitutivamente na leishmânia, possa se tornar um alvo terapêutico para o controle e tratamento da leishmaniose.

A expressão de uma proteína de choque térmico, como STI1, provavelmente não influencia em determinar a resolução ou a gravidade da doença, visto que em ambos os grupos a maioria dos *isolcut* e *isalmuc* tiveram uma expressão similar.

Portanto, os resultados com TSA mostraram que a maior expressão da proteína encontrada nos *isalmuc* pode estar relacionada com a gravidade da doença. A produção de uma proteína imunogênica como TSA pelas leishmânias poderia estar induzindo uma resposta do tipo Th1, que por sua vez ativaria os macrófagos para produzirem uma maior quantidade de moléculas microbicidas. No entanto, a proteína TSA além de ser imunogênica, possui também propriedades antioxidantes, as quais protegem os parasitos desses mecanismos de morte. Assim, uma maior expressão da TSA pode estar relacionada com uma resposta mais exacerbada, que é observada na LM, mas sem a destruição eficiente dos parasitos, pois a mesma proteína além de induzir uma resposta imune, está ao mesmo tempo sendo protetora para ele.

7. CONCLUSÕES

- As leishmânias utilizadas neste estudo se proliferaram similarmente em cultura, demonstrando que, os isolados obtidos de pacientes com lesão mucosa não se diferiam dos isolados de pacientes de lesão cutânea quanto à adaptação em cultura;
- A expressão da proteína META2 não foi diferente entre os grupos, porém, dois isolados do estudo expressaram mais proteína que os demais, os quais um deles, o paciente era portador de lesão mucocutânea e o outro apresentou recidiva de lesões mucosas, sugerindo que esta proteína possa estar envolvida na proteção da leishmânia para o desenvolvimento de uma forma clínica mais grave;
- A expressão proteica de STI e LRR17 foi semelhante entre os isolados de pacientes com lesão cutânea e mucosa em ambas fases de crescimento, estacionária e amastigota, sugerindo que a expressão de uma proteína que é expressa constitutivamente pelo parasito possa ser fundamental para sua sobrevivência, independente da forma clínica desencadeada;
- As duas técnicas implantadas no estudo, *immunoblotting* e citometria de fluxo foram capazes de detectar similarmente a proteína TSA, embora esta última seja mais precisa na detecção de proteínas que a primeira;
- A expressão de TSA foi maior nos isolados oriundos de pacientes com lesão mucosa, em formas promastigotas em fase estacionária e amastigotas. A produção de uma proteína como TSA, a qual possui propriedades antioxidantes e que ao mesmo tempo é imunogênica poderia conferir vantagens na sobrevivência da leishmânia no fagolisossomo do macrófago para a geração de lesões na mucosa;
- Esses resultados nos fornecem importantes informações a respeito da leishmaniose mucosa, sendo que talvez, em um futuro próximo, proteínas como TSA e META2 possam funcionar como marcadores prognósticos para a LM ou mesmo alvos para intervenções terapêuticas contra a doença.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu-Dayyeh I, Hassani K, Westra ER, Mottram JC, Olivier M 2010. Comparative study of the ability of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions. *Infect Immun*, 78, 2438-2445.

Ahmed S, Colmenares M, Soong L, Goldsmith-Pestana K, Munstermann L, Molina R, McMahon-Pratt D 2003. Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun*, 71, 401-410.

Alexander J, Satoskar AR, Russell DG 1999. Leishmania species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci*, 112 Pt 18, 2993-3002.

Alphey MS, Bond CS, Tetaud E, Fairlamb AH, Hunter WN 2000. The structure of reduced trypanothione peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2Cys-peroxiredoxins. *J Mol Biol*, 300, 903-916.

Amato VS, de Andrade HF, Duarte MI 2003. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop*, 85, 39-49.

Ameen M 2010. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clinical and Experimental Dermatology*, 35, 699-705.

Armstrong TC, Patterson JL 1994. Cultivation of *Leishmania braziliensis* in an economical serum-free medium containing human urine. *J Parasitol*, 80, 1030-1032.

Augusto O, Linares E, Giorgio S 1996. Possible roles of nitric oxide and peroxynitrite in murine leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*, 29, 853-862.

Ávila LR,Gomes CM,Tomé FD,Vinaud MC,Pereira LIA,Duarte FB,Ribeiro-Dias F,Dorta ML,Uliana SR,Oliveira MAP 2012. *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from mucosal lesion express more thiol-specific antioxidant protein than parasites isolated from cutaneous lesion *Manuscrito em preparação*.

Bacellar O,Lessa H,Schriefer A,Machado P,Ribeiro de Jesus A,Dutra WO,Gollob KJ,Carvalho EM 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun*, 70, 6734-6740.

Balestieri FM,Queiroz AR,Scavone C,Costa VM,Barral-Netto M,Abrahamsohn Ide A 2002. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect*, 4, 23-29.

Barr SD,Gedamu L 2003. Role of peroxidoxins in *Leishmania chagasi* survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress. *J Biol Chem*, 278, 10816-10823.

Beckman JS 1991. The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. *J Dev Physiol*, 15, 53-59.

Berberich C,Marin M,Ramirez JR,Muskus C,Velez ID 1998. The metacyclic stage-expressed meta-1 gene is conserved between Old and New World *Leishmania* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93, 819-821.

Bhattacharjee S,Gupta G,Bhattacharya P,Adhikari A,Majumdar SB,Majumdar S 2009. Anti-iL-10 mAb protection against experimental visceral leishmaniasis via induction of Th1 cytokines and nitric oxide. *Indian J Exp Biol*, 47, 489-497.

Bhattacharya SK,Sur D,Karbwang J 2006. Childhood visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res*, 123, 353-356.

Bittencourt AL, Barral A 1991. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 86, 51-56.

Blackwell JM 1999. Tumour necrosis factor alpha and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasitol Today*, 15, 73-75.

Blos M, Schleicher U, Soares Rocha FJ, Meissner U, Rollinghoff M, Bogdan C 2003. Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania* major infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. *Eur J Immunol*, 33, 1224-1234.

Boaventura VS, Cafe V, Costa J, Oliveira F, Bafica A, Rosato A, de Freitas LA, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A 2006. Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 75, 267-269.

Brasil Mdsd 2007. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Ministério da Saúde (Normas e Manuais Técnicos)*.

Buchmuller-Rouiller Y, Mauel J 1987. Impairment of the oxidative metabolism of mouse peritoneal macrophages by intracellular *Leishmania* spp. *Infect Immun*, 55, 587-593.

Caceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sanchez MA, Yamamura M, Uyemura K, Modlin RL, Bloom BR, Convit J 1993. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol*, 91, 500-505.

Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MS, Mortara RA, Brodskyn CI, Goncalves HS, Belkaid Y, Barral-Netto M, Barral A, Silva JS 2006. CD4⁺CD25⁺ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis*, 193, 1313-1322.

Campos-Neto A, Porrozzi R, Greeson K, Coler RN, Webb JR, Seiky YA, Reed SG, Grimaldi G, Jr. 2001. Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. *Infect Immun*, 69, 4103-4108.

Campos-Neto A, Webb JR, Greeson K, Coler RN, Skeiky YA, Reed SG 2002. Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTI1 leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. *Infect Immun*, 70, 2828-2836.

Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P 1994. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*, 56, 315-325.

Carvalho LP, Passos S, Bacellar O, Lessa M, Almeida RP, Magalhaes A, Dutra WO, Gollob KJ, Machado P, de Jesus AR 2007. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol*, 29, 251-258.

Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG 1994. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem*, 269, 27670-27678.

Chakravarty J, Kumar S, Trivedi S, Rai VK, Singh A, Ashman JA, Laughlin EM, Coler RN, Kahn SJ, Beckmann AM, Cowgill KD, Reed SG, Sundar S, Piazza FM 2011. A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 29, 3531-3537.

Chamaillard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ 2003. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol*, 5, 581-592.

Chang CS, Inserra TJ, Kink JA, Fong D, Chang KP 1986. Expression and size heterogeneity of a 63 kilodalton membrane glycoprotein during growth and

transformation of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol*, 18, 197-210.

Chang KP, Chaudhuri G, Fong D 1990. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Annu Rev Microbiol*, 44, 499-529.

Chang KP, Reed SG, McGwire BS, Soong L 2003. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop*, 85, 375-390.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*, 5, 873-882.

Coler RN, Skeiky YA, Bernards K, Greeson K, Carter D, Cornellison CD, Modabber F, Campos-Neto A, Reed SG 2002. Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-Cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania major* stress-inducible protein 1, and *Leishmania* elongation initiation factor protects against leishmaniasis. *Infect Immun*, 70, 4215-4225.

Copp SW, Hirai DM, Ferguson SK, Musch TI, Poole DC 2011. Role of neuronal nitric oxide synthase in modulating microvascular and contractile function in rat skeletal muscle. *Microcirculation*, 18, 501-511.

Costa CH, Werneck GL, Costa DL, Holanda TA, Aguiar GB, Carvalho AS, Cavalcanti JC, Santos LS 2010. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. *Rev Soc Bras Med Trop*, 43, 386-392.

Coutinho SG, Oliveira MP, Da-Cruz AM, De Luca PM, Mendonca SC, Bertho AL, Soong L, McMahon-Pratt D 1996. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Exp Parasitol*, 84, 144-155.

Cunha FQ, Assreuy J, Xu D, Charles I, Liew FY, Moncada S 1993. Repeated induction of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol*, 23, 1385-1388.

Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, Azeredo-Coutinho RB, Coutinho SG 2002. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9, 251-256.

Daneshbod Y, Oryan A, Davarmanesh M, Shirian S, Negahban S, Aledavood A, Davarpanah MA, Soleimanpoor H, Daneshbod K 2011. Clinical, histopathologic, and cytologic diagnosis of mucosal leishmaniasis and literature review. *Arch Pathol Lab Med*, 135, 478-482.

David CV, Craft N 2009. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther*, 22, 491-502.

de Souza-Neto SM, Carneiro CM, Vieira LQ, Afonso LC 2004. *Leishmania braziliensis*: partial control of experimental infection by interleukin-12 p40 deficient mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99, 289-294.

de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, 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.

DeKrey GK, Lima HC, Titus RG 1998. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun*, 66, 827-829.

Desjeux P 1996. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol*, 14, 417-423.

Desjeux P 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27, 305-318.

Escobar MA, Martinez F, Scott Smith D, Palma GI 1992. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (tegumentary): a diagnostic challenge. *Trop Doct*, 22 Suppl 1, 69-78;63-64.

Estevez AG, Jordan J 2002. Nitric oxide and superoxide, a deadly cocktail. *Ann N Y Acad Sci*, 962, 207-211.

Forman HJ, Torres M 2002. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med*, 166, S4-8.

Franco FAdL 2008. *Caracterização da região genômica META 1 de Leishmania (Leishmania) amazonensis e comparação com a região ortóloga de L. (L.) major*, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Gamboa D, Van Eys G, Victoir K, Torres K, Adaui V, Arevalo J, Dujardin JC 2007. Putative markers of infective life stages in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasitology*, 134, 1689-1698.

Genestra M, Souza WJ, Guedes-Silva D, Machado GM, Cysne-Finkelstein L, Bezerra RJ, Monteiro F, Leon LL 2006. Nitric oxide biosynthesis by *Leishmania amazonensis* promastigotes containing a high percentage of metacyclic forms. *Arch Microbiol*, 185, 348-354.

Ghose AC, Haldar JP, Pal SC, Mishra BP, Mishra KK 1980. Serological investigations on Indian kala-azar. *Clin Exp Immunol*, 40, 318-326.

Ghoshal A, Gerwig GJ, Kamerling JP, Mandal C 2010. Sialic acids in different *Leishmania* sp., its correlation with nitric oxide resistance and host responses. *Glycobiology*, 20, 553-566.

Girardin SE,Sansonetti PJ,Philpott DJ 2002. Intracellular vs extracellular recognition of pathogens--common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol*, 10, 193-199.

Giudice A,Camada I,Leopoldo PT,Pereira JM,Riley LW,Wilson ME,Ho JL,de Jesus AR,Carvalho EM,Almeida RP 2007. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect Dis*, 7, 7.

Givan AL 2011. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol*, 699, 1-29.

Goto H,Lindoso JA 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 8, 419-433.

Grevelink SA,Lerner EA 1996. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*, 34, 257-272.

Grogl M,Thomason TN,Franke ED 1992. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg*, 47, 117-126.

Gutierrez Y,Salinas GH,Palma G,Valderrama LB,Santrich CV,Saravia NG 1991. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *Am J Trop Med Hyg*, 45, 281-289.

Haidaris CG,Bonventre PF 1982. A role for oxygen-dependent mechanisms in killing of *Leishmania donovani* tissue forms by activated macrophages. *J Immunol*, 129, 850-855.

Handman E 1999. Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol*, 44, 1-39.

Harton JA,Linhoff MW,Zhang J,Ting JP 2002. Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *J Immunol*, 169, 4088-4093.

Herwaldt BL 1999. Leishmaniasis. *Lancet*, 354, 1191-1199.

Iles KE, Forman HJ 2002. Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunol Res*, 26, 95-105.

Ilgoutz SC, McConville MJ 2001. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int J Parasitol*, 31, 899-908.

Inohara N, Nunez G 2003. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol*, 3, 371-382.

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

Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, Zangger H, Revaz-Breton M, Lye LF, Hickerson SM, Beverley SM, Acha-Orbea H, Launois P, Fasel N, Masina S 2011. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science*, 331, 775-778.

Jones TC, Johnson WD, Jr., Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca TF, et al. 1987. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis*, 156, 73-83.

Kedzierski L, Montgomery J, Bullen D, Curtis J, Gardiner E, Jimenez-Ruiz A, Handman E 2004a. A leucine-rich repeat motif of *Leishmania* parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3. *J Immunol*, 172, 4902-4906.

Kedzierski L, Montgomery J, Curtis J, Handman E 2004b. Leucine-rich repeats in host-pathogen interactions. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 52, 104-112.

Killick-Kendrick R, Molyneux D 1981. Transmission of leishmaniasis by bite of phlebotomine sandflies: Possible mechanisms. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 75 (1), 152-154.

Kima PE, Constant SL, Hannum L, Colmenares M, Lee KS, Haberman AM, Shlomchik MJ, McMahon-Pratt D 2000. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*, 191, 1063-1068.

Kimblin N, Peters N, Debrabant A, Secundino N, Egen J, Lawyer P, Fay MP, Kamhawi S, Sacks D 2008. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 10125-10130.

Kobe B, Deisenhofer J 1995. Proteins with leucine-rich repeats. *Curr Opin Struct Biol*, 5, 409-416.

Laemmli UK 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Lainson R, Ryan L, Shaw JJ 1987. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 82, 421-424.

Lang T, Goyard S, Lebastard M, Milon G 2005. Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harbouring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. *Cell Microbiol*, 7, 383-392.

Leite PM, Gomes RS, Figueiredo AB, Fietto JLR, Melo MN, Ribeiro-Dias F, Oliveira MAP, Rabello A, Afonso LCC 2012. Ecto-nucleotidase activity, infectivity and clinical outcome in *Leishmania braziliensis* isolates *Artigo submetido para publicação*.

Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S 1990. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol*, 144, 4794-4797.

Liew FY, Wei XQ, Proudfoot L 1997. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 352, 1311-1315.

Linares E, Giorgio S, Mortara RA, Santos CX, Yamada AT, Augusto O 2001. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. *Free Radic Biol Med*, 30, 1234-1242.

Marino M, Braun L, Cossart P, Ghosh P 2000. A framework for interpreting the leucine-rich repeats of the *Listeria* internalins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 8784-8788.

Marsden PD 1985. Clinical presentations of *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Parasitol Today*, 1, 129-133.

—— 1994. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis L(V)b* in Tres Bracos, Bahia-Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 27, 93-101.

McMahon-Pratt D, Alexander J 2004. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol Rev*, 201, 206-224.

Mendez S, Gurunathan S, Kamhawi S, Belkaid Y, Moga MA, Skeiky YA, Campos-Neto A, Reed S, Seder RA, Sacks D 2001. The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose, intradermal challenge. *J Immunol*, 166, 5122-5128.

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

Moncada S,Palmer RM,Higgs EA 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43, 109-142.

Morrison B,Mendoza I,Delgado D,Reyes Jaimes O,Aranzazu N,Paniz Mondolfi AE 2010. Diffuse (anergic) cutaneous leishmaniasis responding to amphotericin B. *Clin Exp Dermatol*, 35, e116-119.

Mukbel RM,Patten C, Jr.,Gibson K,Ghosh M,Petersen C,Jones DE 2007. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am J Trop Med Hyg*, 76, 669-675.

Murray HW,Berman JD,Davies CR,Saravia NG 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 366, 1561-1577.

Murray HW,Nathan CF 1999. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J Exp Med*, 189, 741-746.

Nicolet CM,Craig EA 1989. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 9, 3638-3646.

Oliveira MA,Pires Ada S,de Bastos RP,Lima GM,Pinto SA,Pereira LI,Pereira AJ,Abrahamsohn Ide A,Dorta ML,Ribeiro-Dias F 2010. *Leishmania spp.* parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 52, 83-88.

Passos VM,Lasmar EB,Gontijo CM,Fernandes O,Degrave W 1996. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91, 19-20.

Pereira LI,Dorta ML,Pereira AJ,Bastos RP,Oliveira MA,Pinto SA,Galdino H, Jr.,Mayrink W,Barcelos W,Toledo VP,Lima GM,Ribeiro-Dias F 2009. Increase of NK

cells and proinflammatory monocytes are associated with the clinical improvement of diffuse cutaneous leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/*Leishmania* antigens. *Am J Trop Med Hyg*, 81, 378-383.

Pinheiro RO 2004. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. *Infarma*, 16, 7-8.

Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceicao-Silva F, Modlin RL 1993. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest*, 91, 1390-1395.

Puentes SM, Da Silva RP, Sacks DL, Hammer CH, Joiner KA 1990. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J Immunol*, 145, 4311-4316.

Rafikov R, Fonseca FV, Kumar S, Pardo D, Darragh C, Elms S, Fulton D, Black SM 2011. eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *J Endocrinol*, 210, 271-284.

Ramasawmy R, Menezes E, Magalhaes A, Oliveira J, Castellucci L, Almeida R, Rosa ME, Guimaraes LH, Lessa M, Noronha E, Wilson ME, Jamieson SE, Kalil J, Blackwell JM, Carvalho EM, de Jesus AR 2010. The -2518bp promoter polymorphism at CCL2/MCP1 influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol*, 10, 607-613.

Ramos CS, Franco FA, Smith DF, Uliana SR 2004. Characterisation of a new *Leishmania* META gene and genomic analysis of the META cluster. *FEMS Microbiol Lett*, 238, 213-219.

Ramos CS, Yokoyama-Yasunaka JK, Guerra-Giraldez C, Price HP, Mortara RA, Smith DF, Uliana SR 2011. *Leishmania amazonensis* META2 protein confers protection against heat shock and oxidative stress. *Exp Parasitol*, 127, 228-237.

Rangel EF,Lainson R 2009. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104, 937-954.

Reiner SL,Locksley RM 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol*, 13, 151-177.

Reithinger R,Dujardin JC,Louzir H,Pirmez C,Alexander B,Brooker S 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 7, 581-596.

Rocha FJ,Schleicher U,Mattner J,Alber G,Bogdan C 2007. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. *Infect Immun*, 75, 3823-3832.

Rojas R,Valderrama L,Valderrama M,Varona MX,Ouellette M,Saravia NG 2006. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *J Infect Dis*, 193, 1375-1383.

Royer MA,Crowe CO 2002. American cutaneous leishmaniasis. *Arch Pathol Lab Med*, 126, 471-473.

Sacks D,Noben-Trauth N 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*, 2, 845-858.

Sacks DL 2001. Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol*, 3, 189-196.

Sacks DL,Modi G,Rowton E,Spath G,Epstein L,Turco SJ,Beverley SM 2000. The role of phosphoglycans in Leishmania-sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 406-411.

Sacks DL, Perkins PV 1984. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, 223, 1417-1419.

Sacks DL 1985. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. *Am J Trop Med Hyg*, 34, 456-459.

Salay G, Dorta ML, Santos NM, Mortara RA, Brodskyn C, Oliveira CI, Barbieri CL, Rodrigues MM 2007. Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Clin Vaccine Immunol*, 14, 1173-1181.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2 ed., New York.

Sanchez JL, Diniega BM, Small JW, Miller RN, Andujar JM, Weina PJ, Lawyer PG, Ballou WR, Lovelace JK 1992. Epidemiologic investigation of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in a defined geographic focus of transmission. *Am J Trop Med Hyg*, 47, 47-54.

Saraiva EM, Andrade AF, de Souza W 1987. Involvement of the macrophage mannose-6-phosphate receptor in the recognition of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Parasitol Res*, 73, 411-416.

Saravia NG, Weigle K, Segura I, Giannini SH, Pacheco R, Labrada LA, Goncalves A 1990. Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection--reactivation or reinfection? *Lancet*, 336, 398-402.

Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araujo ML, Oliveira AL, Pacheco RS, Momen H, Conceicao-Silva F, Coutinho SG, Marzochi KB 1998. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *Am J Trop Med Hyg*, 58, 824-827.

Scott P, Farrell JP 1998. Experimental cutaneous leishmaniasis: induction and regulation of T cells following infection of mice with *Leishmania major*. *Chem Immunol*, 70, 60-80.

Segal BH, Wang XY, Dennis CG, Youn R, Repasky EA, Manjili MH, Subjeck JR 2006. Heat shock proteins as vaccine adjuvants in infections and cancer. *Drug Discov Today*, 11, 534-540.

Shaw JJ 1994. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 89, 471-478.

Silveira FT, Souza AA, Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EE 1991. Cutaneous leishmaniasis in the Amazon region: natural infection of the sandfly *Lutzomyia ubiquitalis* (*Psychodidae: Phlebotominae*) by *Leishmania* (*Viannia*) *Lainsoni* in Para State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 86, 127-130.

Skeiky YA, Coler RN, Brannon M, Stromberg E, Greeson K, Crane RT, Webb JR, Campos-Neto A, Reed SG 2002. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant. *Vaccine*, 20, 3292-3303.

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

Sundar S, Reed SG, Sharma S, Mehrotra A, Murray HW 1997. Circulating T helper 1 (Th1) cell- and Th2 cell-associated cytokines in Indian patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 56, 522-525.

Tabatabaie F, Ghaffari far F, Dalimi A, Sharifi Z, Zavarani Hosseini A 2007. Cloning and Sequencing of *Leishmania major* Thiol-Specific-Antioxidant Antigen (TSA) Gene. *Iranian J Parasitol*, 2, 30-41.

Thiakaki M,Kolli B,Chang KP,Soteriadou K 2006. Down-regulation of gp63 level in *Leishmania amazonensis* promastigotes reduces their infectivity in BALB/c mice. *Microbes Infect*, 8, 1455-1463.

Ting JP,Kastner DL,Hoffman HM 2006. CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nat Rev Immunol*, 6, 183-195.

Torrico MC,De Doncker S,Arevalo J,Le Ray D,Dujardin JC 1999. In vitro promastigote fitness of putative *Leishmania (Viannia) braziliensis/Leishmania (Viannia) peruviana* hybrids. *Acta Trop*, 72, 99-110.

Tripathi P,Singh V,Naik S 2007. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 51, 229-242.

Tuon FF,Amato VS,Bacha HA,Almusawi T,Duarte MI,Amato Neto V 2008. Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infect Immun*, 76, 866-872.

Turco SJ,Descoteaux A 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol*, 46, 65-94.

Turco SJ,Spath GF,Beverley SM 2001. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends Parasitol*, 17, 223-226.

Turetz ML,Machado PR,Ko AI,Alves F,Bittencourt A,Almeida RP,Mobashery N,Johnson WD, Jr.,Carvalho EM 2002. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis*, 186, 1829-1834.

Uliana SR,Goyal N,Freymuller E,Smith DF 1999. Leishmania: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. *Exp Parasitol*, 92, 183-191.

Van Assche T, Deschacht M, da Luz RA, Maes L, Cos P 2011. Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med*, 51, 337-351.

Vargas-Inchaustegui DA, Tai W, Xin L, Hogg AE, Corry DB, Soong L 2009. Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice. *Infect Immun*, 77, 2948-2956.

Vendrame CM, Souza LD, Carvalho MD, Salgado K, Carvalho EM, Goto H 2010. Insulin-like growth factor-I induced and constitutive arginase activity differs among isolates of *Leishmania* derived from patients with diverse clinical forms of *Leishmania braziliensis* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 104, 566-568.

Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ 2004. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*, 90, 31-37.

Webb JR, Kaufmann D, Campos-Neto A, Reed SG 1996. Molecular cloning of a novel protein antigen of *Leishmania major* that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. *J Immunol*, 157, 5034-5041.

Weigle K, Saravia NG 1996. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. *Clin Dermatol*, 14, 433-450.

WHO [database on the Internet]. 2011 [unique. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>].

Wilson ME, Pearson RD 1986. Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. *J Immunol*, 136, 4681-4688.

Anexo 1



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL



PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG Nº 062/2010

Em, 13/05/2010

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL: Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

PESQUISADORES PARTICIPANTES: Lucilla Ribeiro Ávila, Walki Vitório Parreira, Clayson Moura Gomes, Miriam Leandro Dorta, Marina Clare Vinaud e Marco Vitor Silva de Melo

TÍTULO: "Análise da virulência de isolados de leishmania (viannia) braziliensis obtidos de pacientes portadores de leishmaniose cutânea ou mucosa"

Área Temática: Grupo III

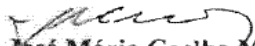
Local de realização: Depto. de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do IPTSP/UFG

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás analisou e **aprovou** o projeto de pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Informamos que **não há** necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

Após início do estudo, o pesquisador responsável **deverá encaminhar ao CEPMHA/HC/UFG, relatórios semestrais** do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).

O CEPMHA/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (*Manual Operacional Para Comitês de Ética em Pesquisa – Item 13*)


Farm. José Mário Coelho Moraes
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

1ª AVENIDA, S/Nº, SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO - CEP: 74.605-050 - FONE: 3269 8338 - FAX: 3269 8426
GOIÂNIA - GOIÁS

**Manuscrito formatado segundo as normas do
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**

Running Title: TSA expression in *L. braziliensis*

Title: *Leishmania (V.) braziliensis* from mucosal lesions express more thiol-specific antioxidant protein (TSA) than parasites from cutaneous lesion

Lucilla Ribeiro Ávila, Clayson Moura Gomes, Fernanda Dias Tome, Marina Claire Vinaud, Ledice Inácia de Araújo Pereira, Sebastião Alves Pinto, Fernanda Bugalho Duarte, Fatima Ribeiro-Dias, Miriam Leandro Dorta, Silvia Bertolli Uliana, Milton Adriano Pelli de Oliveira⁺.

⁺Corresponding author : Milton A. P. Oliveira: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 S/N Setor Universitário, Goiânia, GO 74605-050, Brasil. Tel: (5562) 3209-6126; Fax (5562) 3209-6363; E-mail: miltonoliveira.ufg@gmail.com

Key words: *Leishmania (V.) braziliensis*, thiol-specific antioxidant protein (TSA), interleukin-1 (IL-1)

Financial support: CNPq, CAPES and FAPEG.

ABSTRACT

Mucosal leishmaniasis (ML) caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* is characterized by destructive lesions with exacerbated Th1 specific immune response and low number of parasites. Only a minority of patients develops ML and it is not clear why this occurs. Host factors associated with inflammatory response and parasitic factors related to virulence have been implicated in ML generation. Here, we asked if thiol-specific antioxidant protein (TSA) and stress inducible protein 1 (STI) that are involved in generation of Th1 response and associated with parasite protection is differentially expressed in parasites isolated from cutaneous or mucosal lesion. *Leishmania* was maintained in culture medium to obtain promastigotes or in interferon gamma deficient mice to obtain amastigotes. Higher expression of TSA was observed in amastigote and promastigotes obtained from patient with ML. Additionally, we observed that one isolated obtained from cutaneous lesion induces more IL-1 than isolates obtained from ML. Since TSA is associated with scavenger of reactive oxygen intermediate, which can participates in the IL-1 production, the observation that TSA is more expressed in parasites from ML suggest that *Leishmania* modulate IL-1 prduction via expression of TSA. The particularity of TSA in inducing Th1, protect parasite from oxidative stress and, probably, modulate IL-1 production makes this protein as an important biological marker to identify parasites that causes ML.

INTRODUCTION

Mucosal leishmaniasis (ML) in Brazil is mainly caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and is characterized by destructive lesions generally localized in the nose and mouth and sometimes affecting larynx and trachea (Marsden 1994). Exacerbated Th1 specific immune response, and more recently Th17 response, has been implicated in ML pathogenesis despite the low number of parasites in the lesions (Bacellar et al. 2009, Bacellar et al. 2002, Boaventura et al. 2010).

Only a minority of patients infected with *L. (V.) braziliensis* develops the mucosal form of tegumentary leishmaniasis, which results of the metastatic spread of parasites from cutaneous lesion (Goto and Lindoso 2010, Marsden 1994). Host factors as polymorphism in pro-inflammatory cytokines and chemokines such as tumor necrosis factor (TNF), IL-6 and CCL2 have been described to increase the chance to developing ML (Cabrera et al. 1995, Ramasawmy et al. 2006).

Comparative genomic studies of *Leishmania* parasites show that there is little divergences in terms of genomic sequence between Old World and New World parasites and also between parasites that causes the most different diseases as cutaneous localized (CL) and visceral leishmaniasis (Lynn and McMaster 2008). However, recent data have demonstrated that activity of some enzymes related to the parasite survival, as arginase and ectonucleotidases, are increased in parasites obtained from mucosal lesion (Leite et al. 2012, Vendrame et al. 2010). Therefore it is likely that presence of different genes will have contribution for the disease pathogenesis, but regulation of stage specific

genes would play important role in the pathogenesis of different clinic forms of leishmaniasis.

The *Leishmania* thiol-specific antioxidant protein (TSA) and stress inducible protein 1 (STI) have been described as potential vaccine candidates due to the ability to promote an efficient Th1 immune response in mice (Campos-Neto et al. 2001, Campos-Neto et al. 2002, Salay et al. 2007). Since the differential regulation of a particular gene expression can play important role in pathogenesis of leishmaniasis, we hypothesize that expression of TSA and STI would be enhanced in parasites obtained from mucosal lesion, what could justify the strong specific immune response observed in ML.

MATERIALS AND METHODS

Animals - Male or female C57BL/6 mice with disrupted IFN γ genes (IFN γ KO mice) and female BALB/c mice were bred at the animal facilities of Federal University of Goiás/IPTSP, Brazil. IFN γ KO mice were originally purchased from Jackson Laboratories, ME/USA (B6.129S7-ifng^{tm1Ts}). The mice used were 6-12 weeks old and were maintained in clean conventional mouse facility with *ad libitum* access to water and food.

Parasites - Six clinical field isolates of *Leishmania* were obtained from ATL patients attending at the Anuar Auad Tropical Diseases Hospital in the city of Goiânia, Goiás, Brazil. Parasite isolation was obtained from lesion biopsies performed as part of the diagnostic procedure. Skin biopsies were homogenized and inoculated into IFN γ KO mice footpad (Oliveira et al. 2010). The isolates

were typed by PCR of ribosomal DNA and glucose-6-phosphate dehydrogenase gene as described (Castilho et al. 2003) and identified as *L. (V.) braziliensis*. The patients came from different States of Brazil: Goiás (n=2), Tocantins (n = 1), Pará (n = 2) and Bahia (n = 1). Parasites obtained from the footpad were frozen soon after isolation and stored in the Leishbank-IPTSP/UFG/GO. To obtaining amastigotes, 1×10^6 amastigotes were inoculated into the footpad of IFN γ KO mice, when the footpad lesion reach 3-4 mm of thickness, the mice were sacrificed, footpad was macerated and amastigote separated as described before (Lang et al. 2005). Promastigotes parasites were cultured in 24-well culture plates (TPP, Switzerland) and passed every 2 days starting from 1×10^6 promastigotes per mL in Grace's Insect Medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) supplemented with inactivated 20% fetal calf serum (FCS- Cripion, Andradina, São Paulo, Brazil), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin all purchased from Sigma-Aldrich. The parasites from stationary growth phase were harvested 8 days after the beginning of the culture and washed three times in phosphated saline (PBS) before analyses in western blotting or flow cytometry.

Antibodies and serum against TSA and STI - Recombinant proteins TSA and STI was obtained as described in detail before (Salay et al. 2007). Briefly, Genomic DNA from promastigote forms of *L. (V.) braziliensis* was extracted, amplified by specific primers designed according to the sequences available at GenBank. PCR products were placed on to a agarose gel and excised from it, and the DNA was purified with GeneClean II kit (Bio 101). The products were cloned into the pMOSBlue vector (GE Healthcare - Sweden). The recombinant

clones selected were sequenced. Automatic sequencing of double-stranded DNA was performed by using the BigDye terminator cycle sequencing kit (Perkin-Elmer) on an ABI Prism 377 sequencer (Perkin-Elmer). DNA and predicted amino acid sequences were analyzed by using the DNASTAR package version 5.00 (DNASTAR, Inc.). Alignments were produced by using the CLUSTAL W program. For a bacterial expression vector, it was used the pHIS, plasmid. The ORFs of the genes containing the described restriction site sequences, for directional cloning, were removed from pMOSBlue vector by treatment with the specific restriction enzymes and linked into the pHIS vector treated with the same enzymes. The recombinant plasmids obtained were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) host cells (Novagen, Madison, WI). Bacteria were harvested from 500-ml batch cultures by centrifugation and resuspended in 20 ml of binding buffer (0.1 M sodium phosphate [pH 8.0], 10 mM Tris-HCl [pH 8.0]) containing 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. *E. coli* was lysed by adding 15 mg of lysozyme and rocking for 30 min at 4°C, following sonication (four times for 30 s each time), and then spun at 12,000 rpm for 30 min to pellet the cells. Purified TSA protein was resuspended in PBS and STI were solubilized in 8 M urea.

BALB/c mice were injected SC with 10 µg of recombinant TSA or STI dissolved in 50 µL PBS plus 50 µL complete Freund adjuvant (Sigma-Aldrich). After 30, 60 and 90 days, mice were injected SC with protein dissolved in 50 µL PBS plus 50 µL incomplete Freund adjuvant (Sigma-Aldrich). After 100 days, mice were sacrificed and serum obtained were used in western blotting or purified in Protein G agarose column (Sigma) followed by biotinylation with Biotin-N-hydroxysuccinimide ester (Sigma-Aldrich) to be used in flow cytometry.

Immunoblot - Extracts from *L. (V.) braziliensis* promastigotes and amastigotes were obtained after incubation of 1×10^9 parasites in 100 μ L of lise buffer (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 2% SDS; 1% proteinase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)). Ten micro liters contained 2×10^7 lysed parasites were suspended in sample buffer (62,5 mM Tris pH 6,8; 2,5% SDS; 10% glycerol; 2,5% β -mercaptoethanol; 1% EDTA; 0,015% bromophenol blue) and injected to SDS–12% PAGE, followed by transference to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% powdered skim milk in PBS and incubated for 1 h with sera from BALB/c mice immunized with the recombinant proteins diluted 1:400 or anti-GAPDH diluted 1:3000 (Sigma-Aldrich). After a washing step with 0.05% Tween 20 in PBS, the nitrocellulose strips were incubated with peroxidase-conjugated anti-mouse and then developed with SuperSignal West Pico Trial (Pierce).

FACS analysis - Before labeling, parasites were spun and resuspended at 2×10^7 cells in 250 μ L of 3% FCS; 2% paraformaldehyde (Merk) in PBS for 15 min. Parasites were washed twice with 3% FCS in PBS, resuspended in 0.1% saponin (Sigma-Aldrich) in PBS for 15 min. After washing the parasites twice they were incubated for 15 min with 2μ /mL of biotinilated control or anti-TSA antibody in 3% FCS in PBS. The FITC- conjugated goat anti-rat IgG antibody (Serotec, UK) was added for 20 min, followed by washings with 3% FCS in PBS. Three thousand events were collected for each sample in a flow cytometer (C6, Accuri). The percentage of labeled cells and the increase of fluorescence in relation to the controls labeled with irrelevant antibodies were

analyzed in software FCS 4.0. The increase of the fluorescence was calculated by comparing the medians of fluorescence obtained for the labeled cells with the median of fluorescence obtained for control-stained cells.

Analyses of IL-1 production - Peripheral blood was obtained by venipuncture from adult healthy donors at the blood bank of Clinical Hospital of Goias using EDTA as anticoagulant. PBMC were separated on a Ficoll-Paque[®] PLUS (GE Healthcare) and cultured ($1,5 \times 10^6$ cells/well) in 24-well plates in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 50 µM of 2-mercaptoethanol. Supernatants were harvested 24 h after amastigote stimuli. The IL-1 β production was assayed on supernatants by commercial kit Ready-Set-Go (eBioscience, San Diego, USA) according to the manufacture instructions.

Ethical considerations - The Ethical Committee for Human and Animal research of the "Hospital das Clínicas" of the Federal University of Goias approved all procedures reported in this study (Protocol 062/2010). All donors and patients were fully informed and consented to participate in this study.

Statistical analysis - The data were presented as mean $\pm$ SD and were compared for significance by unpaired Student's *t* test with Welch's correction, using the Graph-Pad Prism Software 5.0 (Inc. San Diego, CA, USA). $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

The patients that provided the biopsies had putative area of infection at North, Northeast and Center of Brazil. Two patients did not receive any treatment, since they did not return after diagnose. Three patients were treated with pentavalent antimonial (Glucantime® 20 mg/kg/20days) and presented clinical cure. The patient that hold JBC8m parasite was treated with glucantime associated with pentoxifylline, since he was treated before with glucantime and had a relapse of lesion. The patient that hold SMB7c parasite presented a nasal mucosal lesion beyond the cutaneous lesion, but the parasite was obtained from cutaneous lesion. All isolates were able to infect IFN γ KO mice, producing uncontrolled lesion, what make it possible to obtain a large number of amastigotes to perform the experiments. Additionally, all parasites adapted similarly to culture conditions, achieved stationary phase of growth among the 3rd to 5th day and maintained alive until the 10th day (Fig. 1).

Expression of STI and TSA was observed in all promastigotes at the stationary phase and in amastigote form (Fig. 2). The amount of TSA was significantly higher in promastigotes in stationary phase of growth obtained from mucosal lesion than those obtained from cutaneous lesion (Fig. 2A and E). Although the amount of TSA is slightly higher parasites from mucosal lesions, this difference did not reached statistically significance (Fig. 2C and G). The expression of STI was similarly distributed in promastigotes and in amastigotes from all isolated (Fig. 2B, D,F,H).

The higher expression of TSA in promastigotes was confirmed by flow cytometry analyses. In Fig. 3 is showed that parasites from mucosal lesion

presented more TSA per cell than parasites from cutaneous lesion as observed by higher fluorescence intensity (Fig. 3A and C), however, the amount of positive cells for TSA was similar in all isolates (Fig. 3B).

Although we did not detect difference in the TSA expression in amastigotes by immunoblotting analysis, we observed that parasites from mucosal lesions presented more TSA positive cells than amastigotes from cutaneous lesion (Fig. 4A and B). The last group presents a population that did not label to TSA and other that express TSA, while in parasites from mucosal lesion it was observed a more homogeneous distribution of TSA without separation in two populations (Fig. 4A). The difference between the two groups regarding to the fluorescence intensity did not achieved statistically significance, but the total of TSA expressed on the sample (measured by the product of % of positive cells x intensity of fluorescence) was higher in mucosal isolates (Fig. 4D).

TSA protein is able to scavenger reactive oxygen intermediate (ROI) that participate in microbial killing and inflammasoma formation. The last one is essential for IL-1 production. Our group demonstrated that amastigotes of *L. (V.) braziliensis* specie are able to induce IL-1 production by PBMC from health donors (Gomes et al. 2012). To observe if parasites obtained from cutaneous lesion have different ability to induce IL-1, we stimulate PBMC from health donors with amastigotes obtained from cutaneous or mucosal lesions. It was observed that all parasites are able to stimulate IL-1 production that was slightly higher when PBMC were stimulated with parasites from cutaneous lesion, but it did not achieved statistically significance ($p=0.27$) (Fig. 5A). In those experiments it was observed a great variability in the production of this cytokine

among the donors. To minimize the influence of the donor, it was analyzed the IL-1 production from a single PBMC donor stimulated with different parasites (Figure 5B-J). Interestingly, the isolate from cutaneous lesion JCJ8c induced more IL-1 than all parasites from mucosal lesion (Figure 5 B-D). This ability to induce more IL-1 was not shared by the other isolates from cutaneous lesion (Figure 5 E-J).

DISCUSSION

Comparative genomic study of *Leishmania* parasites show that there is little divergences in terms of genomic sequence, suggesting that the differences in the presence of genes will have little contribution for the disease pathogenesis. On the other hand, differences or similarities at the regulation of protein expressed at stage specific would play more important role in pathogenesis of different clinic forms of leishmaniasis (Lynn and McMaster 2008). Here we showed that expression of TSA was higher in promastigotes and amastigotes parasites obtained from mucosal lesion. TSA is a protein able to activate an effective cellular immune response to protect mice against leishmaniasis being used with STI protein as an experimental vaccine (Campos-Neto et al. 2001, Campos-Neto et al. 2002). Although STI expression was not different among isolates, the high expression of TSA in parasites obtained from ML corroborates the idea that those parasites are potentially more able to activate strong immune response, since in ML it is observed an exaggerated cellular immune response with high production of type 1 cytokine as IFN γ and TNF (Bacellar et al. 2002). Type 1 immune response is associated

with control of different *Leishmania* species, including *L. (V.) braziliensis*, however, in ML, the parasite is only partially controlled (Bacellar et al. 2002, Rocha et al. 2007), and intense tissue destruction is observed in the site of infection (Amato et al. 2003).

To survive in such dangerous environment, amastigotes that cause ML must develop some additional mechanism to escape from immune system, as demonstrated by an increased on resistance to microbicidal activity of murine phagocytes (Giudice et al. 2007, Leite et al. 2012, Vendrame et al. 2010). TSA expressed by *Saccharomyces cerevisiae* was able to scavenger ROI produced during the respiratory burst and increasing survival of the fungi inside macrophage (Chae et al. 1994), suggesting that TSA expressed in *Leishmania* parasites is also responsible for some resistance to the oxidative burst. Since amastigote in vertebrate host survive exclusively inside of macrophages, the higher expression of TSA in *Leishmania* from ML corroborate the idea that those parasites are better protected than parasites from CL, besides this protein activate a strong immune response.

Beyond to be important for microbial killing, ROIs are important molecules for cell signaling in macrophages (Iles and Forman 2002). Recently, it was described that ROIs contributes to the formation of inflammasoma, what is important for IL-1 production (Bauernfeind et al. 2011). This data suggests that parasite expressing less TSA would produce more IL-1, since less TSA allow formation of more ROIs which activate more inflammasoma and consequently more IL-1 would be produced. Interestingly, it was demonstrated here that one of isolates (JCJ8c) obtained from CL was able to induce more IL-1 than all isolates obtained from ML.

The lower production of the pro-inflammatory cytokine IL-1 is in apparently disagreement with the strong inflammatory response observed in ML. However, IL-1 is an important cytokine to recruit immature myeloid cells that are permissive to parasitic infection and dissemination (Voronov et al. 2010). Our hypothesis is that parasite that cause ML induces less IL-1 and consequently delayed the disease by decreasing the number of host cells. In addition, parasites also delayed the generation specific immune response by decreasing antigen presentation, since IL-1 is able to improve the ability of dendritic cells to present *Leishmania* antigens (Xin et al. 2007). This hypothesis was partially confirmed by Leite, 2012 that shows that in experimental infection of mice, the lesions caused by PPS6m is delayed when compared with lesion caused by parasite obtained from CL. In addition, the expression of co-stimulatory molecules is lower in dendritic cells infected with parasite from ML than CL (Leite et al. 2012).

Comparison of *Leishmania (V.) braziliensis* isolated from CL and ML are demonstrating that parasites from ML presented a different profile of protein expression or activity that can be related with this destructive form of disease. Most of works showed an increasing on the ability of ML parasites to survive in the host as compared to parasite from CL (Giudice et al. 2007, Leite et al. 2012, Vendrame et al. 2010). Here we demonstrated that parasite from ML express more TSA, a protein that participate in protection of parasite but also are highly immunogenic. This particularity of TSA suggest that this protein is an important biological marker to identify and for prognosis of ML.

REFERENCES

- Amato VS, de Andrade HF, and Duarte MI 2003. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop* 85: 39-49.
- Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO, Scott P, and Carvalho EM 2009. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 200: 75-78.
- Bacellar O, Lessa H, Schrieffer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, and Carvalho EM 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70: 6734-6740.
- Bauernfeind F, Bartok E, Rieger A, Franchi L, Nunez G, and Hornung V 2011. Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol* 187: 613-617.
- Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, de Andrade J, Dos Santos WL, Clarencio J, Silva JS, Borges VM, Barral-Netto M, Brodskyn CI, and Barral A 2010. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol* 40: 2830-2836.
- Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, and Blackwell JM 1995. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 182: 1259-1264.
- Campos-Neto A, Porrozzi R, Greeson K, Coler RN, Webb JR, Seiky YA, Reed SG, and Grimaldi G, Jr. 2001. Protection against cutaneous leishmaniasis

induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. *Infect Immun* 69: 4103-4108.

Campos-Neto A, Webb JR, Greeson K, Coler RN, Skeiky YA, and Reed SG 2002. Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTI1 leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. *Infect Immun* 70: 2828-2836.

Castilho TM, Shaw JJ, and Floeter-Winter LM 2003. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *J Clin Microbiol* 41: 540-546.

Chae HZ, Chung SJ, and Rhee SG 1994. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* 269: 27670-27678.

Giudice A, Camada I, Leopoldo PT, Pereira JM, Riley LW, Wilson ME, Ho JL, de Jesus AR, Carvalho EM, and Almeida RP 2007. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect Dis* 7: 7.

Gomes CM, Ávila LR, Pinto SA, Duarte FB, Pereira LIA, Abrahamsohn IA, Dorta ML, Ribeiro-Dias F, L.Q. V, and Oliveira MAP 2012. Amastigotes of *Leishmania (Viannia) braziliensis* activate mononuclear cells from health donors to produce cytokines important to generate Th17 and regulatory T cells.. *Parasite Immunology*: submitted.

Goto H, and Lindoso JA 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8: 419-433.

Iles KE, and Forman HJ 2002. Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunol Res* 26: 95-105.

Lang T, Goyard S, Lebastard M, and Milon G 2005. Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. *Cell Microbiol* 7: 383-392.

Leite PM, Gomes RS, Figueiredo AB, Melo MN, Ribeiro-Dias F, Oliveira MAP, Rabello A, and Afonso LCC 2012. Ecto-nucleotidase activity, infectivity and clinical outcome in *Leishmania braziliensis* isolates. *Plos Neglect Diseases*: submitted.

Lynn MA, and McMaster WR 2008. *Leishmania*: conserved evolution--diverse diseases. *Trends Parasitol* 24: 103-105.

Marsden PD 1994. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Tres Bracos, Bahia-Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 27: 93-101.

Oliveira MAP, Pires AS, Bastos RP, Lima GMCA, Pinto SA, Pereira LIA, Pereira AJCS, Abrahamsohn IA, Dorta ML, and Ribeiro-Dias F 2010. *Leishmania spp.* parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 52: 83-88.

Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Fae KC, Martello FG, Muller NG, Cavalcanti VL, Ianni B, Mady C, Kalil J, and Goldberg AC 2006. The monocyte chemoattractant protein-1 gene polymorphism is associated with cardiomyopathy in human chagas disease. *Clin Infect Dis* 43: 305-311.

Rocha FJ, Schleicher U, Mattner J, Alber G, and Bogdan C 2007. Cytokines, Signaling Pathways, and Effector Molecules Required for the Control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Mice. *Infect Immun* 75: 3823-3832.

Salay G, Dorta ML, Santos NM, Mortara RA, Brodskyn C, Oliveira CI, Barbieri CL, and Rodrigues MM 2007. Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Clin Vaccine Immunol* 14: 1173-1181.

Vendrame CM, Souza LD, Carvalho MD, Salgado K, Carvalho EM, and Goto H 2010. Insulin-like growth factor-I induced and constitutive arginase activity differs among isolates of *Leishmania* derived from patients with diverse clinical forms of *Leishmania braziliensis* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104: 566-568.

Voronov E, Dotan S, Gayvoronsky L, White RM, Cohen I, Krelin Y, Benchetrit F, Elkabets M, Huszar M, El-On J, and Apte RN 2010. IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. *Int Immunol* 22: 245-257.

Xin L, Li Y, and Soong L 2007. Role of interleukin-1beta in activating the CD11c(high) CD45RB- dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*-specific CD4+ T cells *in vitro* and *in vivo*. *Infect Immun* 75: 5018-5026.

LEGENDS TO FIGURE

Fig. 1: parasites obtained from cutaneous or mucosal lesion presented similar growth in culture. Parasites isolated from cutaneous (JCJ8c, RPL5c and SMB7c) or mucosal (ASL9m, JBC8m and PPS6m) lesion were cultured in Grace's medium starting from 1×10^6 leishmanias/mL. All parasites were quantified daily in Neubauer chamber. The data represent mean $\pm$ SD of at least three experiments.

Fig. 2: promastigotes in stationary phase of growth obtained from mucosal lesion express more TSA protein than parasites obtained from cutaneous lesion. Lisates of parasites in stationary phase of culture (8 days) (A and B) or lisates of amastigotes purified from infected mice (C and D) were assayed by western blotting for expression of TSA (A and C) or STI (B and D). A, B, C and D are presented TSA (28KDa), STI (66 KDa) and GAPDH (34 kDa). E, F, G and H represents the densitometry mean $\pm$ SD of three experiments respectively presented in A, B, C and D. * indicate statistical difference between parasites from mucosal or cutaneous lesion ($p < 0.05$, unpaired Student's T test with Welch's correction).

Fig. 3: expression of TSA per promastigotes from mucosal lesion is higher the promastigotes from cutaneous lesion. Parasites isolated from cutaneous (JCJ8c, RPL5c and SMB7c) or mucosal (ASL9m, JBC8m and PPS6m) lesion were cultured in Grace's medium and at the eighth day analyzed for TSA expression by flow cytometry. In A is presented representative histogram of

TSA expression. Parasites were stained with isotype control (stippled line) or anti-TSA antibody (continuous line). Hatched area presented the subtraction of TSA labeled histogram from isotype control. The % of positive cells (B), fluorescence mean (C) and the product of % positive cells X fluorescence mean (D) are presented as mean $\pm$ SD from three experiments. * indicate statistical difference between parasites from mucosal or cutaneous lesion ($p < 0.05$, unpaired Student's T test with Welch's correction).

Fig. 4: percentage of amastigote expressing TSA is higher in parasites obtained from mucosal lesion than cutaneous lesion. Parasites isolated from cutaneous (JCJ8c, RPL5c and SMB7c) or mucosal (ASL9m, JBC8m and PPS6m) lesion were inoculated into IFN γ KO mice to obtaining amastigotes that were analyzed for TSA expression by flow cytometry. Figure A shows one representative histograms of TSA expression from three experiments. Parasites were stained with isotype control (stippled line) or anti-TSA antibody (continuous line). Black area presented the subtraction of TSA labeled histogram from isotype control. The % of positive cells (B), fluorescence mean (C) and the product of % positive cells X fluorescence mean (D) are presented as average $\pm$ SD from three experiments. * indicate statistical difference between parasites from mucosal or cutaneous lesion ($p < 0.05$, unpaired Student's T test with Welch's correction).

Fig. 5: amastigotes from isolate JCJ8c induces less IL-1 production in PBMC from health donors than amastigotes obtained from mucosal lesion. Parasites isolated from cutaneous (JCJ8c, RPL5c and SMB7c) or mucosal (ASL9m, JBC8m and PPS6m) lesion were inoculated into IFN γ KO mice to obtaining

amastigotes. PBMC from health donors were purified by Ficoll-Paque® PLUS and cultured for 24 h at $1,5 \times 10^6$ cells/500 μ L in absence (control) or presence of amastigotes (3×10^5 leishmanias/500 μ L). In A is presented the mean $\pm$ SD of IL-1 production detected in culture supernatant after amastigote stimulus and respective control measured by ELISA. Comparison between two isolates stimulating PBMC from the same donor was represented in B-J. Each symbol represents the amount of cytokine of one donor stimulated by one isolate of amastigote and the line link the production of cytokine from the same donor stimulated by different parasites. * indicate statistical difference by paired student's test between PBMCs stimulated with two different amastigotes isolates ($p < 0.05$).