

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ELISANGELA MADUREIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA
“KINETOPLASTID MEMBRANE PROTEIN-11” (KMP-11) E
VIRULÊNCIA DE *Leishmania amazonensis***

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Biologia Parasitária

Orientador: Dr. Sergio Coutinho Furtado de Mendonça

RIO DE JANEIRO

2011

S237

Santos, Elisangela Madureira dos.

Avaliação da associação entre expressão da proteína “Kinetoplastid membrane protein-11” (KMP-11) e virulência de *Leishmania amazonensis*. / Elisangela Madureira dos Santos. – Rio de Janeiro, 2011.

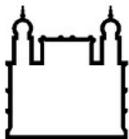
xv, 78 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2011.

Bibliografia: f. 63-78

1. Leishmaniose. 2. Virulência. 3. KMP-11. I. Título.

CDD 616.9364



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: ELISANGELA MADUREIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA
“KINETOPLASTID MEMBRANE PROTEIN-11” (KMP-11) E
VIRULÊNCIA DE *Leishmania amazonensis***

Orientador: Dr. Sergio Coutinho Furtado de Mendonça

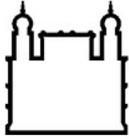
Aprovada em 28/04/2011.

Examinadores:

Dr. Carlos Roberto Alves **Presidente**

Dr^a. Verônica Figueiredo Amaral

Dr^a. Andréa Henriques Pons



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

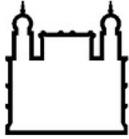
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA “KINETOPLASTID MEMBRANE PROTEIN-11” (KMP-11) E VIRULÊNCIA DE *Leishmania amazonensis*

RESUMO

As leishmanioses formam um grupo de doenças que afetam 350 milhões de pessoas atualmente, atingindo 88 países em todo o mundo com uma estimativa de 1-2 milhões de novos casos por ano. O desfecho da infecção causada por *Leishmania* depende tanto de fatores do patógeno como do hospedeiro, embora a virulência de *Leishmania* possa ser modulada por fatores ambientais e genéticos relacionados aos hospedeiros mamíferos e vetores, os determinantes moleculares são elementos-chave no estabelecimento da infecção, ou seja, são os fatores que determinam a virulência. A KMP-11 é uma glicoproteína que está presente em todos os cinetoplastídeos. O presente estudo avaliou a expressão do gene de KMP-11 de *L. amazonensis* ao nível de RNA e ao nível de proteína, durante passagens sucessivas de promastigotas de fase estacionária através de cultivo *in vitro*, investigando se há associação entre a sua expressão e a virulência dos parasitos. A avaliação da virulência dos parasitos mantidos em cultura foi realizada através do acompanhamento da evolução da infecção experimental murina (modelo *in vivo*) durante um período de dez semanas, juntamente com a observação do surgimento de ulceração. A quantificação da carga parasitária foi realizada nos linfonodos drenantes das lesões, através da técnica de diluição limitante. A avaliação também foi realizada pela infecção de macrófagos murinos (modelo *in vitro*). Os resultados de medição de pata foram analisados pelo teste não paramétrico ANOVA 2 fatores, seguido do pós-teste de Bonferroni. Além disso, foi realizada a determinação da proporção de metacíclicas nos promastigotas de fase estacionária mantidos em cultura, através da técnica de lise pelo complemento. Nossos resultados mostraram que há um decréscimo da virulência dos promastigotas de fase estacionária ao longo do número de passagens, pois os camundongos infectados com as passagens iniciais desenvolveram lesões maiores do que aqueles com os promastigotas mantidos em cultura por mais tempo. Quanto ao surgimento de ulcerações, na 10ª semana pós-infecção, todos os animais infectados com promastigotas de 1ª passagem apresentavam lesões ulceradas, enquanto que nenhum dos camundongos infectados com promastigotas de 20ª passagem apresentava lesão ulcerada. Na infecção *in vitro*, a carga parasitária nos macrófagos testados diminuiu em função do número das subculturas, o que foi demonstrado através do decréscimo da porcentagem média de macrófagos infectados e pela quantidade média de amastigotas a cada 100 macrófagos infectados. A quantificação da carga parasitária foi realizada nos linfonodos drenantes da

lesão dos camundongos infectados, confirmando a diminuição da virulência dos promastigotas. A quantificação da proporção de promastigotas metacíclicas demonstrou que a porcentagem diminuiu ao longo do tempo de subcultivo. A avaliação da expressão de KMP-11 na superfície de promastigotas por citometria de fluxo demonstrou um decréscimo na expressão da proteína proporcional ao número de subculturas. Verificou-se, portanto, uma associação entre a expressão da proteína KMP-11 e a virulência de promastigotas de *L. amazonensis*. Os resultados dos ensaios de PCR em tempo real demonstraram que não há diferença estatisticamente significativa na quantidade de transcritos do gene da proteína KMP-11 entre as passagens analisadas. Entretanto, a perda da virulência associada com a diminuição da expressão da proteína KMP-11 indica que esta molécula possui uma função na infectividade dos promastigotas de *Leishmania amazonensis*, atuando possivelmente como um fator de virulência.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

EVALUATION OF THE ASSOCIATION BETWEEN THE EXPRESSION OF THE PROTEIN “KINETOPLASTID MEMBRANE PROTEIN-11” (KMP-11) AND *Leishmania amazonensis* VIRULENCE

ABSTRACT

The leishmaniasis are a group of diseases that currently, affects 350 million people reaching 88 countries throughout world with an estimated incidence of 1-2 million new cases per year. The outcome of the infection caused by *Leishmania* depends on factors from the pathogen and from the host. Although *Leishmania* virulence can be modulated by environmental and genetic factors related to mammalian hosts and vectors, molecular determinants are key elements in the establishment of infection and for the determination, of virulence. KMP-11 is a glycoprotein which is present in all kinetoplastids. This study evaluated the gene expression of KMP-11 in *L. amazonensis* at RNA level and at protein level, during successive passages of in vitro culture, investigating a possible correlation between KMP-11 expression and virulence of parasites. The evaluation of the virulence of cultured parasites was performed by monitoring of the progression of the lesions in experimental murine infection (in vivo model) during ten weeks, along with the emergence of cutaneous ulcers. The quantification of parasite load was performed on draining lymph nodes using the limiting dilution analysis. The assessment of parasite virulence was also performed by the infection of murine macrophages (in vitro model). The paw measurement results were analyzed by nonparametric test ANOVA 2 way, followed by Bonferroni post-test. Furthermore, the metacyclic promastigotes proportion in stationary growth phase from cultures with different numbers of passages was evaluated by complement lysis. Our results showed a decrease in promastigotes of stationary phase virulence that correlated with the increase of the number of passages, as mice infected with the early passages developed larger lesions than those infected with promastigotes cultured for longer periods and higher numbers of passages. Concerning the development of ulcers, at 10th week post-infection, all animals infected with promastigotes of first passage presented ulcerated lesions, whereas none of the mice infected mice with promastigotes of the 20th passage showed an ulcerated lesion. Analyzing the *in vitro* infection, the parasite burden in macrophages decreased with the number of subcultures, as demonstrated by the decrease in the percentage of infected macrophages and in the number of amastigotes per 100 infected macrophages. The quantification of parasites in draining lymph nodes of the infected mice confirmed the decrease in the virulence of promastigotes from cultures with more passages. The estimation of the metacyclic promastigote proportions showed that the percentages decline through the time of subculture. The evaluation of KMP-11 expression on the surface of promastigotes by flow cytometry showed a decrease in protein expression proportional to

the number of subcultures. Therefore, there was an association between the expression of KMP-11 protein and the virulence of *L. amazonensis* promastigotes. The results of real-time PCR assays showed that there is no statistically significant difference in the amount of gene transcripts of KMP-11 protein in the analyzed passages. However, the loss of virulence associated with decreased protein expression of KMP-11 indicates that this molecule may have a role in promastigotes infectivity of *Leishmania amazonensis*, possibly acting as a virulence factor.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por me guardar em todos os momentos e me dar força para continuar nos momentos de fraqueza.
- Ao meu orientador Sérgio Mendonça pela paciência, dedicação e por tudo que você me ensinou durante essa trajetória.
- Aos meus pais Angela e Eliseu, meu irmão Alan, minha cunhada Sávia e minha avó Odila pelo apoio, paciência e amor. Eu nunca conseguiria sem vocês.
- Ao meu namorado Valdir pela paciência de ouvir sobre todos os experimentos e torcer para dar certo, por entender os meus vários momentos de ausência, pelo apoio nos momentos felizes e de tristeza. Amo você.
- A todos os membros do laboratório de Imunoparasitologia: Dra. Paula de Luca, Dra. Lea Cysne, Dra. Joseli de Oliveira, Dr. Álvaro Bertho, Juan Camilo, Daniel Lacerda, Amanda Beatriz, Thalita Gagini, Josué Costa, Rodrigo Nunes, Virgínia Araújo, Amanda Ribeiro, Rafaela Veiga e Raquel Ferraz.
- A todos os amigos da minha turma de mestrado, por todos os momentos de alegria, desespero, pelas risadas. A nossa turma é MARA!
- À Dra. Denise Matos pela intensa dedicação e ajuda na realização dos experimentos.
- À Dra. Lea Cysne pela ajuda valiosa com as culturas de *Leishmania*.
- Ao Dr. Carlos Alves pela ótima revisão da dissertação
- À minha amiga Bárbara Tainan, que me acompanha a vida toda, essa vitória é sua também.
- À minha amiga Nathália Bittencourt, por toda a paciência em me ouvir reclamando dos experimentos que não davam certo.
- Às minhas amigas e companheiras de mestrado Raquel e Amanda, obrigada por fazerem o difícil ficar divertido.
- Aos membros do Laboratório de Hanseníase em especial ao Dr. Milton Ozório, Anna Beatriz Robotton e Tiana Brito por toda a ajuda na realização dos ensaios de PCR em tempo real.
- Ao Dr. Marcelo Alves pela ajuda na análise estatística dos ensaios de PCR em tempo real.

Para minha mãe e meu pai: Angela e Eliseu

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
AGRADECIMENTOS.....	viii
SUMÁRIO.....	x
SUMÁRIO DE TABELAS.....	xii
SUMÁRIO DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
1. Introdução.....	01
1.1. Breve histórico da doença.....	01
1.2. As leishmanioses.....	03
1.2.1. Definição.....	03
1.2.2. Agente Etiológico.....	04
1.2.3. Ciclo biológico.....	07
1.2.4. Vetor.....	09
1.2.5. Epidemiologia.....	10
1.2.6. Relação parasito-hospedeiro.....	14
1.2.7. Patologia.....	15
1.3. <i>Leishmania amazonensis</i>	18
1.4. Definição de virulência.....	20
1.5. Fatores que determinam a virulência em <i>Leishmania</i>	21
1.6. KMP-11.....	24
1.6.1. Histórico.....	24
1.6.2. Possíveis funções.....	26
1.6.3. KMP-11 como fator de virulência.....	27
2. Objetivos.....	28
2.1. Objetivo geral.....	28
2.2. Objetivos Específicos.....	28
3. Materiais e Métodos.....	29
3.1. Ética e biossegurança.....	29
3.2. Parasitos.....	29
3.3. Animais de experimentação.....	29
3.4. Culturas de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	29
3.5. Determinação da proporção de promastigotas metacíclicas na fase estacionária.....	30
3.6. Preparação do extrato total de promastigotas.....	30

3.7. Isolamento e purificação do RNA.....	30
3.8. Análise qualitativa de RNA.....	31
3.9. Desenho dos iniciadores oligonucleotídeos específicos.....	31
3.10. Síntese de cDNA.....	32
3.11. PCR quantitativo (PCR em tempo real).....	32
3.12. Análise por citometria de fluxo.....	33
3.13. Avaliação da virulência das formas promastigotas de fase estacionária de culturas com diferentes números de passagens.....	34
3.13.1. Infecção <i>in vivo</i>	34
3.13.2. Infecção <i>in vitro</i>	34
3.13.3. Quantificação da carga parasitária.....	35
3.14. Análise estatística.....	36
4. Resultados.....	37
4.1. Curva de crescimento de <i>L. amazonensis</i> (IFLA/BR/67/PH8).....	37
4.2. Perda da virulência ao longo do cultivo <i>in vitro</i>	38
4.2.1. Infecção <i>in vivo</i>	38
4.2.2 Perda da virulência <i>in vitro</i>	41
4.2.3. Quantificação da carga parasitária.....	44
4.3. Determinação da proporção de promastigotas metacíclicas na fase estacionária.....	44
4.4. Avaliação da expressão do gene de KMP-11 ao longo do cultivo <i>in vitro</i>	46
4.4.1. Avaliação da expressão de KMP-11 ao longo do cultivo <i>in vitro</i> por citometria de fluxo.....	46
4.4.2. Avaliação da expressão do gene de KMP-11 a nível de RNA ao longo do cultivo <i>in vitro</i> pelo método de PCR em tempo real.....	48
5. Discussão.....	52
6. Conclusões.....	60
7. Perspectivas.....	61
8. Referências Bibliográficas.....	62

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1.1. Principais espécies de <i>Leishmania</i> dermatrópicas causadoras de doença humana no continente americano, pertencentes aos subgêneros <i>Viannia</i> e <i>Leishmania</i>	06
Tabela 1.2. Espécies de <i>Leishmania</i> do Novo Mundo e seus respectivos vetores.....	10
Tabela 3.1. Oligonucleotídeos utilizados para <i>L. amazonensis</i>	31
Tabela 4.1. Análise estatística realizada com o pós teste de Bonferroni entre os resultados de medição de pata.....	40

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1.1. Imagem de uma cerâmica pré-Inca: o Huaco mochica.....	01
Figura 1.2. Distribuição geográfica das leishmanioses cutânea e mucocutânea no Novo Mundo.....	11
Figura 1.3. Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Velho e Novo Mundo.....	12
Figura 4.1. Curva de crescimento de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> da cepa (IFLA/BR/67/PH8).....	37
Figura 4.2. Progressão da lesão em camundongos infectados com diferentes subculturas de promastigotas de fase estacionária.....	39
Figura 4.3. Número de camundongos com ulcerações das lesões.....	41
Figura 4.4. Porcentagem de macrófagos infectados utilizando promastigotas de fase estacionária de 1 ^a , 5 ^a e 10 ^a passagens.....	42
Figura 4.5. Quantidade média de amastigotas a cada 100 macrófagos infectados utilizando promastigotas de fase estacionária de 1 ^a , 5 ^a e 10 ^a passagens.....	43
Figura 4.6. Porcentagem de promastigotas metacíclicas nas culturas de promastigotas de fase estacionária de 1 ^a , 10 ^a e 20 ^o passagens.....	45
Figura 4.7. Análise por citometria de fluxo da expressão de KMP-11 nas formas promastigotas de fase estacionária de <i>L. amazonensis</i> em diferentes passagens.....	47
Figura 4.8. Análise qualitativa através da eletroforese em gel de agarose 1,2% do RNA total do extrato de promastigotas de 1 ^a e 5 ^a passagens.....	49
Figura 4.9. Curva de dissociação da PCR em tempo real.....	50
Figura 4.10. Quantificação do gene de KMP-11 de <i>L. amazonensis</i> por PCR em tempo real.....	51

Lista de abreviaturas

bp: Pares de bases

BSA: Bovine Serum Albumin

cDNA: DNA complementar

CDs: Células dendríticas

CECAL: Centro de Criação de Animais de Laboratório

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

Cp: Crossing point

CPs: Cisteinoproteínas

dNTP: Desoxirribonucleotídeo trifosfato

dTT: Dithiothreitol

GP63: Leishmanolisina

HIV: “Human immunodeficiency virus”

IFN- γ : Interferon- γ

IgG: Imunoglobulina

IL-10: Interleucina-10

IL-12: Interleucina-12

IL-13: Interleucina-4

IL-1 β : Interleucina-1 beta

IL-4: Interleucina-4

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

kDa: Kilodaltons

kDNA: DNA do cinetoplasto

KMP-11: Kinetoplastid Membrane Protein 11

LC: Leishmaniose cutânea

LCD: Leishmaniose cutânea difusa

LCDiss: Leishmaniose cutânea disseminada

LCL: Leishmaniose cutânea localizada

LM: Leishmaniose mucosa ou mucocutânea

LPG: Lipofosfoglicano

LPGAP: “LPG-associated protein”

LT: Leishmaniose tegumentar

LTA: Leishmaniose tegumentar americana

LV: Leishmaniose visceral

MFI: Médias de intensidade de fluorescência
MHC II: Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
MOPS: “3-(N-morpholino) propanesulfonic acid”
mRNA: RNA mensageiro
MSP: “Major surface protein”
OMS: Organização Mundial de Saúde
PCR: Polymerase Chain Reaction
pH: Potencial de Hidrogênio
PMSF: Fenilmetilsulfonil fluoreto
RNA Pol II: “RNA polimerase II”
RNA: Ácido ribonucleico
RPM: Rotações por minuto
RPMI: “Roswell Park Memorial Institute Medium”
RT-PCR: “Reverse transcription polymerase chain reaction”
SFB: Soro fetal bovino
SPF: “Specific pathogen-free”
T_m: “Melting temperature”
TNF- α : Fator de necrose tumoral-alfa
UTR: “Unstraslated region”
VPs: Vacúolo parasitóforo

1. Introdução

1.1. Breve histórico da doença

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença antiga que foi retratada em figuras, papiros, estátuas e cerâmicas (Altamirano-Enciso et al., 2003). Há relatos e descrições na literatura do século I sobre a presença da moléstia na Ásia Central sob o nome de “úlceras de Balkh”, referente a uma cidade ao norte do Afeganistão, e também como “úlceras de Delhi” (Camargo & Barcinski, 2003). Nas Américas foram encontradas cerâmicas incas, datadas de 400 a 900 d.C (Fig.2.1), apresentando imagens humanas com mutilações de lábios e nariz. Os estudos arqueológicos desenvolvidos nessas cerâmicas incas, também chamados de “huacos” peruanos, puderam assegurar a ocorrência da uta e espúndia - denominações locais para as formas cutânea e mucosa da LT, respectivamente - entre os incas durante a era pré-colombiana, embora a princípio tenham sido confundidas com a sífilis (Furtado & Vale, 2005). Esse achado indica uma possível origem autóctone da doença no continente americano.



Fig 1.1: Imagem de uma cerâmica pré-Inca, o Huaco mochica exibindo mutilação do nariz e lábio superior, lesões sugestivas de espúndia (leishmaniose cutâneo- mucosa) (Rabello E, 1925; Altamirano- Enciso et al., 2003)

No Brasil, a primeira referência à doença pode ser deduzida de um relato de viagem de Frei Don Hypolito Sanchez Rangel de Farias y Quiros, desde Tabatinga, no Amazonas, até o Pará, realizada em 1827, o relato está registrado no Pastoral Religioso Político Geográfico, citado no livro “Antiguidad de la syphillis en el Perú”. Em seu texto o Frei relata a ocorrência de leishmaniose e sua associação com os vetores, que ele chama de “mosquitos” (Rabello E, 1925; Camargo & Barcinski, 2003).

Em 1903, na Índia, Leishman e Donovan descreveram um protozoário como causador do “kala_azar” indiano, pois o parasito foi identificado através da análise do baço de um paciente. Neste mesmo ano Ross criou o gênero *Leishmania*, em honra do seu descobridor Leishman. Em 1909, Adolfo Lindenberg comunicou ter achado parasito semelhante na úlcera de Bauru, que ele identificou como o mesmo agente responsável pelo botão do oriente, ou seja, formas de *Leishmania* idênticas à *Leishmania tropica* (Altamirano-Enciso et al., 2003; Camargo & Barcinski, 2003; Costa LMC, 1998).

Em 1911, Gaspar Vianna caracterizou a *L. braziliensis* como agente etiológico da leishmaniose tegumentar americana, conhecida por denominações populares como “úlcera de Bauru”, “ferida brava” ou “nariz de tapir”. Em 1912, foi introduzido o uso do tártaro emético na terapêutica da LTA permanecendo os antimoniais como drogas de eleição para o tratamento das leishmanioses até os dias atuais (Vianna G, 1911 ; Costa LMC, 1998, Furtado & Vale, 2005). Em 1923, Rabello criou o termo leishmaniose tegumentar americana, denominação que abrange as formas cutâneas e mucosas da doença (Grevelink & Lerner, 1996).

Os primeiros registros acerca do calazar datam de 1835, quando médicos gregos descreveram a existência, na ilha de Hidra, próximo a Creta, de uma esplenomegalia infantil que era chamada de “ponos” ou “hapoplinaikon”, segundo os registros, assemelhava-se ao calazar. O termo “kala-azar” (febre negra) surgiu devido à febre e ao escurecimento da pele, bastante comuns em pacientes indianos. Esse termo foi aplicado por médicos indianos em 1869, mais tarde essa doença passou a ser denominada como leishmaniose visceral (LV) (Altamirano-Enciso et al., 2003; Marzochi et al., 1981). A LV descrita na época se caracterizava por debilidade geral, acessos de febre irregulares e repetitivos, além de anemia severa, atrofia muscular, entre outras manifestações clínicas. A relação entre o calazar e o parasito foi estabelecida por Ross em 1903, que o denominou de *Leishmania donovani* (Donovan C, 1903).

Em 1913, foi diagnosticado no Paraguai o que parece ser o primeiro caso de LV em paciente oriundo do Brasil: um imigrante italiano que morava em Santos, Estado de São Paulo, ficou doente após uma viagem ao Estado do Mato Grosso. Em 1923, o médico Armando Tavares

comunicou o primeiro caso de LV no Estado de Pernambuco (Alencar, 1977; Dantas-Torres F, 2006). Excluindo-se o caso diagnosticado no Paraguai, esse certamente trata-se do primeiro caso de LV descrito em território brasileiro, sendo um importante marco na história dessa doença no Brasil.

1.2. As leishmanioses

1.2.1 Definição

As leishmanioses afetam atualmente 350 milhões de homens, mulheres e crianças de 88 países em todo o mundo. Estima-se que 1-2 milhões de novos casos ocorram a cada ano. Estas doenças são caracterizadas por promoverem um amplo espectro de manifestações clínicas, que são dependentes das espécies responsáveis por iniciar a infecção, do status imunológico e da composição genética do hospedeiro. As leishmanioses são uma das dez doenças tropicais que são alvos para pesquisa e financiamento pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Alexander et al., 1999 ; WHO, 2011).

São doenças causadas por protozoários digenéticos, unicelulares, heteroxenos pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, que compreendem 30 espécies, das quais 20 causam doenças à espécie humana (Marzochi et al., 1992). A ordem Kinetoplastida caracteriza-se por apresentar mitocôndria única, denominada cinetoplasto, que possui uma porção rica em kDNA (DNA do cinetoplasto) que representa o material genético mitocondrial (Grimaldi Jr & Tesh, 1993). Esses parasitos são transmitidos pelas fêmeas infectadas de insetos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo mundo. Nas Américas, a LTA é considerada uma zoonose primária de mamíferos silvestres (roedores, marsupiais (gambá), edentados e primatas), podendo acometer também animais domésticos. O homem pode adquirir a infecção ao entrar em contato com as áreas florestais onde existem as enzootias pelas diferentes espécies de *Leishmania* (Basano, 2004), ou através da transmissão domiciliar ou peridomiciliar, onde o ciclo é mantido por animais domésticos que atuam como reservatório e flebotomíneos que circulam pelo peridomicílio (Falqueto et al., 1986; Falqueto et al., 1991).

A doença é considerada uma antroponose quando o homem se torna reservatório da doença, como ocorre no calazar indiano ou na leishmaniose cutânea urbana do Oriente Médio (Ashford et al., 2000; Costa JML, 2005). Os protozoários do gênero *Leishmania* são bem

adaptados ao parasitismo de várias espécies de hospedeiros mamíferos, de vetores e a diversos ecossistemas em regiões tropicais e subtropicais.

As leishmanioses são classificadas de acordo com as regiões geográficas onde se apresentam: Novo Mundo e Velho Mundo. As leishmanioses do Velho Mundo são causadas por espécies de *Leishmania* encontradas na Bacia Mediterrânea, Oriente Médio, África e Ásia. As leishmanioses do Novo Mundo são causadas por espécies encontradas no México, América Central e América do Sul. Algumas espécies, tais como *L. major*, *L. tropica*, e *L. aethiopica* são responsáveis pelas leishmanioses cutâneas do Velho Mundo, caracterizadas por lesões cutâneas papulares, nodulares ou ulcerosas. As principais espécies responsáveis pela leishmaniose tegumentar americana (LTA) no novo mundo são *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, e *L. (V) guyanensis* (Grimaldi Jr & Tesh, 1993; Ministério da Saúde, 2006).

Clinicamente, a leishmaniose pode ser dividida em dois grandes grupos: visceral e tegumentar. A leishmaniose visceral ou calazar é causada por espécies viscerotrópicas, como *L. donovani* e *L. infantum*, que parasitam órgãos internos, principalmente aqueles ricos em fagócitos mononucleares: fígado, baço, medula óssea e linfonodos. Já a leishmaniose tegumentar afeta a pele e/ou mucosas, tendo como agentes causadores, várias espécies de *Leishmania* (Azeredo-Coutinho RBG, 2008).

1.2.2 Agente Etiológico

Os protozoários do gênero *Leishmania* são classificados taxonomicamente da seguinte forma (Lainson & Shaw, 1979; Simpson et al., 2006):

- Domínio Eucarya;
- Reino Excavata;
- Filo Euglenozoa;
- Classe Kinetoplastea;
- Sub-Classe Metakinetoplastina;
- Ordem Kinetoplastida;
- Subordem Trypanosomatina;
- Família Trypanosomatidae;
- Gênero *Leishmania*

- Subgêneros *Viannia* e *Leishmania*.

Desde a criação do gênero *Leishmania*, descrito originalmente por Ross em 1903, o número de espécies reconhecidas continua aumentando. Até o início da década de 1960, a classificação destes parasitos baseava-se principalmente na localização geográfica, posto que a morfologia dos parasitos à microscopia óptica não permitia sua distinção. Com isso, no Brasil até a década de 70, todos os casos de LT eram atribuídos a *L. braziliensis* (Basano AS, 2004; Furtado & Vale, 2005). Com o aprimoramento das técnicas de biologia molecular, bioquímica, imunologia, além da intensificação dos estudos ecológicos, epidemiológicos e da biologia do parasito associado ao comportamento das diferentes espécies no inseto vetor, outras espécies foram descritas.

Em 1979, foi realizada uma nova organização sistemática dos táxons por Lainson & Shaw, devido a algumas espécies apresentarem diferentes padrões de crescimento no tubo digestivo dos Flebótomos. Esses diferentes padrões possuem importância evolucionária, taxonômica e biológica. Os mesmos autores propuseram em 1982, uma subdivisão do gênero *Leishmania*. Nessa nova subdivisão, o grupo com padrão de desenvolvimento na seção “peripilaria” ou intestino posterior, foi denominado subgênero *Viannia* e o outro grupo de crescimento na seção “suprapilaria” ou intestino médio e anterior foi denominado como subgênero *Leishmania* (Grimaldi & Tesh 1993; Lainson & Shaw (1979). No Velho Mundo as leishmanioses somente são causadas por espécies do subgênero *Leishmania*, já no Novo Mundo os dois subgêneros (*Viannia* e *Leishmania*) estão presentes (Lainson R, 1988).

Atualmente há oito espécies registradas como causadoras da LTA no Brasil: *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (Viannia) naiffi*, *L. (Viannia) shawi*, *L. (Viannia) lindenbergi* e *L. (V.) panamensis* (Furtado & Vale, 2005).

Nas Américas são reconhecidas 14 espécies dermatrópicas de *Leishmania*, causadoras de doença humana (tabela 2.2) e somente uma espécie causadora da doença visceral, *Leishmania (L.) chagasi* (Grimaldi & Tesh, 1993).

Tabela 1.1: Principais espécies de *Leishmania* dermatrópicas causadoras de doença humana no continente americano, pertencentes aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (Grimaldi & Tesh, 1993; Marzochi et al., 1992).

Subgênero <i>Viannia</i> (Lainson & Shaw, 1972)	Distribuição geográfica
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> Vianna, 1911	América do Sul, América Central e México
<i>L. (V.) peruviana</i> Vélez, 1913	Peru
<i>L. (V.) guyanensis</i> Floch, 1954	Calha norte da Bacia Amazônica, Guianas e países do noroeste sul- americano
<i>L. (V.) panamensis</i> (Lainson & Shaw, 1972)	América Central e América do Sul
<i>L. (V.) lainsoni</i> (Silveira et al., 1987)	Norte do Estado do Pará
<i>L. (V.) naiiffi</i> (Lainson et al., 1990)	Região Amazônica do Brasil
<i>L. (V.) shawi</i> (Shaw et al., 1991)	Região Amazônica do Brasil
Subgênero <i>Leishmania</i> (Safianova, 1982)	Distribuição geográfica
<i>L. (L.) mexicana</i> (Biagi, 1953)	México e América Central
<i>L. (L.) amazonensis</i> (Lainson & Shaw, 1972)	América Central e regiões Norte, Nordeste, Centro- Oeste e Sudeste do Brasil
<i>L. (L.) venezuelensis</i> (Bonfante-Garrido, 1980)	Venezuela
<i>L. (L.) pifanoi</i> (Medina & Romero, 1959)	Venezuela

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam duas formas biológicas distintas (amastigota e promastigota). No hospedeiro invertebrado, apresenta-se na forma de promastigotas, extracelulares de aproximadamente 15-30µm, que se desenvolvem e se multiplicam no intestino do inseto vetor. Essas formas evolutivas apresentam um longo flagelo livre e cinetoplasto localizado na região anterior. No hospedeiro vertebrado, as leishmanias se apresentam na forma de amastigotas (não móvel - arredondada - 3-6µm), que são parasitos intracelulares obrigatórios, residem e se multiplicam nas células fagocíticas mononucleares,

principalmente os macrófagos. Nas duas formas, o flagelo emerge de uma bolsa flagelar e na forma amastigota aparece restrito àquela bolsa (Marzochi et al., 1992; Webster et al., 1993).

Muitas espécies de *Leishmania* podem ser facilmente mantidas em meio de cultura, que são divididos em duas categorias: semisólido bifásico e líquido monofásico (Rodrigues et al., 2010).

1.2.3 – Ciclo biológico

O ciclo biológico de *Leishmania* envolve o hospedeiro mamífero (mamíferos silvestres, domésticos ou o próprio homem) e o inseto vetor. O flebótomo não infectado aspira sangue e células parasitadas da derme do hospedeiro mamífero, ação facilitada pela participação de substâncias vasodilatadoras como maxadilán e substâncias de ação anticoagulante (Lerner et al., 1991). Os amastigotas são liberadas dentro do intestino do vetor, provenientes de macrófagos infectados adquiridos durante o repasto sanguíneo. Dentro do intestino do vetor é formada uma rede fibrosa, formada por quitina e diversas proteínas associadas à membrana peritrófica (estrutura anatômica composta de quitina e proteínas (peritrofinas), que separa o alimento do epitélio do intestino médio). Nessa rede fibrosa ocorre a diferenciação dos amastigotas em promastigotas procíclicas, que são células pequenas e de formato ovóide. Elas se dividem rapidamente e não causam a doença no hospedeiro invertebrado. De 60 a 72 horas após o repasto sanguíneo inicia-se a evasão da membrana peritrófica (Sacks & Perkins, 1985; Sacks & Kamhawi, 2001).

Os promastigotas procíclicos expressam grandes quantidades de lipofosfoglicano (LPG) na sua superfície, um glicoconjugado abundantemente presente nas membranas dos promastigotas. A conformação do LPG das formas procíclicas permite que elas possam aderir às paredes do tubo digestivo do inseto. Os promastigotas procíclicos se diferenciam nas nectomônadas, uma forma maior e delgada que atravessa a membrana peritrófica e adere ao epitélio do intestino e migra em direção a região anterior. As formas nectomônadas se transformam nas leptomônadas, uma forma menor e com capacidade de replicação. As formas promastigotas metacíclicas se diferenciam a partir das formas leptomônadas. As metacíclicas apresentam um corpo celular pequeno e delgado, com um flagelo duas vezes maior que o corpo, que confere rápida motilidade. A diferenciação nos promastigotas metacíclicos altamente infectivos é denominada metaciclogênese e é acompanhada de mudanças na estrutura do LPG, regulação positiva da leishmanolisina (GP63) e mudanças no conteúdo enzimático, dependendo

da espécie analisada. As alterações bioquímicas no LPG permitem que os promastigotas se desprendam da parede do intestino do vetor e possam migrar para o esôfago e faringe (Bates P, 2007; Kamhaki S, 2006). Logo após, as formas promastigotas metacíclicas vão se alojar na probóscide do vetor, bloqueando a entrada de sangue. Quando um novo repasto sanguíneo ocorrer, as formas infectivas são injetadas na pele através de movimentos repetidos de sucção e regurgitação realizados pelo vetor (Alexander et al., 1999; Pimenta et al., 1991).

No momento da inoculação dos parasitos na pele, ocorre também a introdução de pequenas quantidades de saliva pelo vetor, pois o inseto dilacera o tecido do hospedeiro, formando condições para obter o sangue durante a alimentação. A saliva do inseto é inoculada neste ambiente e exerce papel importante atuando como anticoagulante, vasodilatador e antiagregador de plaquetas, favorecendo o fluxo de sangue e a linfa intersticial para o alimento. Além destes efeitos, sabe-se que fatores presentes na saliva de flebotômíneos possuem ação quimiotática para monócitos e ação imunoreguladora, com capacidade de interagir com os macrófagos. As propriedades imunossupressoras ou imunogênicas da saliva podem modificar a resposta do hospedeiro à leishmaniose (Sacks & Kamhawi, 2001; Neves et al., 2005).

A infecção no hospedeiro mamífero se inicia após a inoculação dos promastigotas metacíclicos, essas formas são fagocitadas pelos macrófagos, onde se diferenciam na forma amastigota. Esse estágio inicial é crucial na sobrevivência dos parasitos, pois é necessário que eles estabeleçam mecanismos de proteção contra as atividades microbicidas dos macrófagos (Alexander et al., 1999). As moléculas de GP63 e LPG são cruciais para que o estabelecimento da infecção ocorra, pois elas medeiam a adesão ao macrófago. Os parasitos são interiorizados no fagossoma ainda ligado à membrana do macrófago, que se funde com lisossomas secundários, produzindo o fagolisossoma. A inibição da fusão de lisossomas ao fagossoma é mediada pelo LPG (Desjardins & Descoteaux, 1997). Durante este processo de diferenciação, há um aumento na expressão de alguns genes que provavelmente irão adaptar os parasitos a sobreviver no ambiente hostil dos fagolisossomas (Grimaldi & Tesh, 1993).

As formas amastigotas se dividem de forma contínua por divisão binária até que ocorra a ruptura da célula hospedeira, com liberação de novas formas amastigotas, que então vão invadir novas células, perpetuando o ciclo.

1.2.4 - Vetor

Os vetores da leishmaniose são insetos hematófagos pertencentes ao gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). Estes são classificados da seguinte forma (Sharma & Singh, 2008):

- Reino Animalia
- Filo Arthropoda
- Superclasse Hexapoda
- Classe Insecta
- Subordem Nematocera
- Família Psychodidae
- Subfamília Phlebotominae
- Gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*

Os flebotomíneos são insetos pequenos de 2 a 3mm, no Brasil recebem nomes populares conforme a região: cangalhinha, birigui, mosquito-palha, murutinga, dentre outros. Eles iniciam suas atividades ao anoitecer. Somente as fêmeas são hematófagas, pois necessitam da alimentação sanguínea para que ocorra a maturação dos ovos, que se processa em sete dias (Marzochi et al., 1992).

As diversas espécies de flebotomíneos possuem diferentes habitats preferenciais. Algumas vivem nas partes altas das árvores, com ecologia arbórea definida. Outras espécies estão mais presentes a nível do solo, cada uma delas com uma ecologia própria (Costa LMC, 1998).

Tabela 1.2- Espécies de *Leishmania* do Novo Mundo e seus respectivos vetores - Adaptado de Sharma & Singh, 2008.

Espécie de Leishmania	Vetor
<i>L. (L.) amazonensis,</i>	<i>Lu. flaviscutellata</i>
<i>L. (L.) chagasi</i>	<i>Lu. longipalpis</i>
<i>L. (L.) mexicana</i>	<i>Lu. olmeca</i> <i>olmeça</i>
<i>L. (V.) braziliensis,</i>	<i>Lu. Wellcomei</i>
<i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>Lu. Umbralitis</i>
<i>L. (V.) lainsoni</i>	<i>Lu. Ubiquitalis</i>
<i>L. (V.) naiffi</i>	<i>Lu. Ayrozai</i>
<i>L. (V.) shawi</i>	<i>Lu. Whitmani</i>

1.2.5 – Epidemiologia

As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública, representando um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. A OMS estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco com registro aproximado de dois milhões de novos casos, cerca de 60.000 mortes por ano são causadas pelas leishmanioses. Essas doenças afetam 88 países, dos quais 76 são classificados como países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, incluindo 13 dos países menos desenvolvidos do mundo. As leishmanioses são consideradas pela OMS como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, devido à sua grande prevalência, capacidade de produzir deformidades e ao grande número de mortes causadas pela leishmaniose visceral (Desjeux P, 2001; Ministério da Saúde, 2007; Neves et al., 2005).

A epidemiologia das leishmanioses é bastante diversa entre as 20 espécies que são patogênicas para os humanos e entre as 30 espécies de flebotomíneos que têm sido identificadas como vetores. A incidência das leishmanioses apresenta crescimento progressivo nos últimos 20 anos e vem adquirindo importância crescente, tanto pelo aumento do número de casos como pela difusão geográfica da doença. Atualmente, a doença tem sido reportada em regiões que anteriormente eram consideradas como não endêmicas, como o Alto Nilo Ocidental, no Sudão (Desjeux P, 2004).

A incidência das leishmanioses não é uniformemente distribuída nas áreas endêmicas, pois aproximadamente 90% dos casos de leishmaniose cutânea (LC) ocorrem em apenas sete

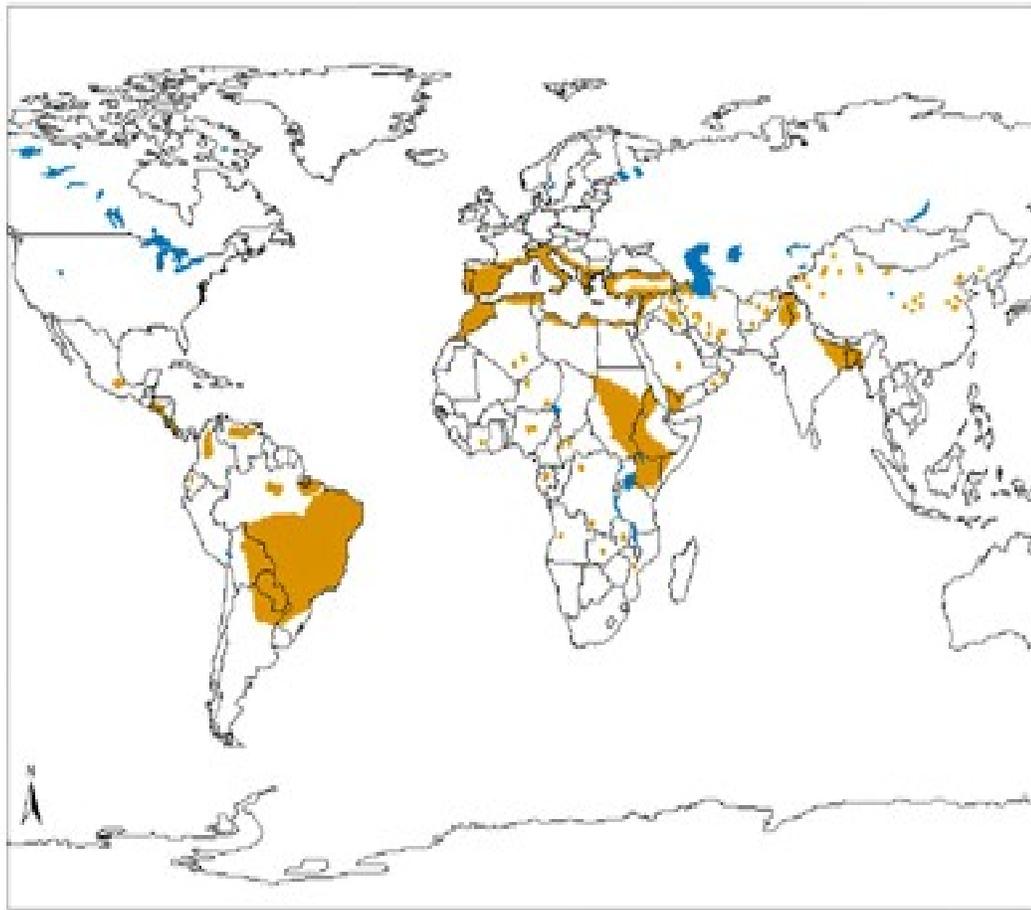


Fig 1.3. Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Velho e Novo Mundo. As regiões em laranja representam as áreas com a presença da leishmaniose visceral e as regiões em azul representam coleções de água (WHO, 2011).

No Brasil, a incidência da LTA vem crescendo desde 1987. Há uma incidência de 17,51 casos por 100.000 habitantes. O aumento do número de casos registrados nos últimos anos deve-se principalmente à invasão de áreas para mineração, derrubada de florestas para produção agropecuária, crescimento populacional sem urbanização ou também a uma maior capacidade de detecção. A LTA é considerada uma das afecções dermatológicas que merece bastante atenção, pois apresenta risco de ocorrência de deformidades no ser humano, com reflexos no campo social e econômico. Essa doença apresenta ampla distribuição, com registros de casos em todos os estados brasileiros (Ministério da Saúde, 2007; Costa JML, 2005).

Atualmente, a LV é considerada endêmica em pelo menos 65 países, com 500.000 casos novos registrados anualmente (Desjeaux P, 2004). O Brasil é responsável por aproximadamente 90% dos casos registrados na América Latina. Nesse país, a doença é considerada endêmica em 19 estados, sendo que a maior parte dos casos está concentrada na região Nordeste (Ministério da Saúde, 2007). Os cães formam um importante reservatório doméstico para o agente etiológico *Leishmania chagasi*. A importância do cão como reservatório se deve ao freqüente contato entre cães e os humanos, também pelo fato desses animais apresentarem também a infecção assintomática. Os cães infectados podem desenvolver um grande espectro de sinais clínicos como lindadenopatia, perda de peso, hepatoesplenomegalia, conjuntivite e lesões cutâneas (Dantas-Torres F, 2006). O principal inseto vetor é a *Lutzomyia longipalpis*, que coloniza facilmente as áreas ao redor das casas, se adaptando a altas temperaturas e baixa umidade. A distribuição geográfica da LV no Brasil varia do norte da Região Amazônica até o sudeste do país (Marzochi et al., 2009).

As leishmanioses são endemias dinâmicas e as circunstâncias de transmissão estão continuamente mudando em função de fatores ambientais, demográficos e comportamentais. As mudanças no habitat dos hospedeiros, condições de imunossupressão (como infecção por HIV (vírus da imunodeficiência humana) e terapias associadas ao transplante de órgãos) e resistência dos parasitos e dos vetores respectivamente aos fármacos e inseticidas em uso, contribuem para o panorama de mudança no padrão de transmissão das leishmanioses (Gramiccia & Gradoni, 2005).

No Brasil, são reconhecidos três padrões epidemiológicos de transmissão da leishmaniose tegumentar: padrão de transmissão silvestre, no qual a leishmaniose é uma zoonose de animais silvestres no interior da mata; padrão ocupacional, no qual a transmissão está associada à exploração desordenada da floresta e derrubada de matas e padrão periurbano/rural, que está associado ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados em centros urbanos associados a regiões florestais (Ministério da Saúde, 2007). Conforme os parasitos e os vetores se adaptam às condições do ambiente, a epidemiologia das doenças associadas também se modifica ao longo do tempo. Entretanto, após o desflorestamento e colonização humana, algumas espécies vetoras têm sido capazes de se adaptar às mudanças ecológicas decorrentes. Por conseguinte, os parasitos passam então a realizar um ciclo biológico envolvendo espécies de vetores peridomésticos e animais como cães e cavalos (Grimaldi Jr & Tesh, 1993).

Há fatores que dificultam a aquisição do conhecimento sobre a real prevalência das diferentes leishmanioses, dentre eles estão: subnotificação, pois a notificação compulsória ocorre

apenas em 32 dos 88 países onde as leishmanioses são prevalentes, diagnóstico incorreto, infecções inaparentes, variações das respostas do hospedeiro e a variedade de agentes etiológicos envolvidos. As atividades humanas vêm provocando mudanças ambientais que alteram o perfil epidemiológico das leishmanioses, tanto nas áreas onde a transmissão é florestal (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*), como nas áreas que a transmissão é periurbana e peridomiciliar, envolvendo reservatórios domésticos (*L. chagasi*, *L. braziliensis* e *L. venezuelensis*) (Marzochi et al., 1992).

As leishmanioses possuem padrões epidemiológicos extremamente diversos que dependem da região geográfica e também de fatores socioculturais e genéticos da população envolvida. Esta diversidade impossibilita o estabelecimento de padrões epidemiológicos e ecológicos comuns para as diversas regiões, dificultando assim, a adoção de medidas de controle da doença (Dourado et al., 1998).

Em teoria, o controle das leishmanioses seria estabelecido através da interrupção do ciclo de transmissão. As medidas empregadas para este fim apresentam eficácia limitada, pois essas doenças são mantidas em ciclos naturais envolvendo hospedeiros silvestres. Atualmente, as ações empregadas para a prevenção e controle da leishmaniose são: controle do vetor, eliminação dos hospedeiros reservatórios, vigilância, tratamento dos casos humanos e proteção pessoal (Grimaldi Jr & Tesh, 1993).

As leishmanioses encontram-se entre as doenças tropicais mais negligenciadas, atingindo principalmente às populações mais pobres. O risco atual das populações contraírem leishmanioses está aumentando drasticamente e sempre relacionado com três fatores principais: desmatamento, aquecimento global e pobreza (Desjeux P, 2001). Associados a esses fatores estão questões que ampliam o problema como a desnutrição, condições sanitárias deficientes e serviços inadequados de saúde (Desjeux P, 2004).

1.2.6. Relação parasito-hospedeiro

O desfecho da infecção causada por *Leishmania* depende tanto de fatores do patógeno como do hospedeiro. Os macrófagos são as células do hospedeiro especializadas na captação e também responsáveis pelo desenvolvimento intracelular do parasito. Essas células são primordiais no controle da infecção. Apesar disso, a maioria das espécies de *Leishmania* possui estratégias para vencer a resposta imune inata durante a fase inicial da infecção, através da

regulação negativa de múltiplas funções celulares do hospedeiro, como a produção de interleucina 12 (IL-12), óxido nítrico e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), maturação do fagolisossomo e apresentação de antígenos pelo complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II) (Gómez & Olivier, 2010).

Durante a infecção por *Leishmania*, os neutrófilos são recrutados nas primeiras horas após a infecção, seguidos pelos monócitos e macrófagos. Os neutrófilos podem internalizar os promastigotas, onde os parasitos sobrevivem, porém não se multiplicam, entretanto, essas células atuam como hospedeiras temporárias nas primeiras horas após a infecção já que os neutrófilos possuem uma duração limitada, entrando em apoptose dentro de 6-12 horas (Zandbergen et al., 2001). Em *L. major* foi demonstrado que os parasitos retardam o início do processo de apoptose dos neutrófilos em 24 horas, após esse período os macrófagos são recrutados para o sítio de infecção (1-2 dias depois) onde os neutrófilos que entraram em apoptose tardia são fagocitados juntamente com os parasitos. É importante ressaltar que a fagocitose de células apoptóticas pelos macrófagos não ativa os mecanismos efetores antimicrobianos, dessa forma os parasitos podem entrar silenciosamente nos macrófagos, evadindo o sistema imune (Aga et al., 2002).

Há outras células que funcionam como “alvos seguros” durante a infecção pelo parasito *Leishmania*, entre elas estão células precursoras mielóides imaturas, monócitos, hepatócitos, e fibroblastos, as últimas são rapidamente infectadas por promastigotas e amastigotas de *L. major*, porém não ineficientes em eliminar esses parasitos (Bogdan et al., 2000; Bogdan C, 2008).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios no hospedeiro vertebrado. Desta forma, eles desenvolveram estratégias complexas para realizar a evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro que ocorrem tanto antes (ataque do sistema complemento), durante (efeitos tóxicos dos metabólitos de oxigênio produzidos durante a explosão respiratória) e após (hidrolases lisossomais e/ou óxido nítrico) a entrada na célula hospedeira (Hall et al., 1991; Grimaldi & Tesh, 1993).

1.2.7. Patologia

O termo leishmanioses descreve uma variedade de doenças resultantes da infecção de qualquer um dos protozoários parasitas do gênero *Leishmania*. As leishmanioses podem ser divididas em leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). A LT é subdividida em leishmaniose cutânea do velho e leishmaniose tegumentar americana (LTA).

A LV ou calazar é uma doença infecciosa sistêmica, de evolução crônica, caracterizada por febre irregular de intensidade média e de longa duração, hepatoesplenomegalia, sendo a esplenomegalia a característica mais importante e freqüente. A medula óssea é em geral encontrada com hiperplasia e densamente parasitada. Durante as fases tardias da infecção, ocorre desregulação da hematopoese, caracterizada pela diminuição da produção celular. Essa doença é considerada a forma mais grave das leishmanioses, pois costuma ser fatal se não tratada. Os pacientes apresentam uma depressão da imunidade celular o que predispõe o hospedeiro a infecções secundárias (Neves et al., 2005; Saha et al., 2006; Grevelink et al., 1996).

A leishmaniose cutânea do Velho Mundo é causada pela *L. major* (agente etiológico da LC zoonótica), *L. tropica* (LC antroponótica) e *L. aethiopica* que também pode produzir as formas difusa e mucosa. As lesões começam como pequenos nódulos que aumentam lentamente seguido de ulceração, que acometem geralmente áreas da face, que evoluem para cura espontânea na grande maioria dos casos. Raramente há acometimento de mucosas (Alrajhi A, 2003).

Na LTA, a virulência, patogenicidade e manifestações clínicas são espécie-específicas, então as formas clínicas da doença irão depender da espécie e do sistema imune do hospedeiro (David & Craft, 2009). A LTA pode apresentar as seguintes formas clínicas: LC, leishmaniose mucosa ou mucocutânea (LM) e leishmaniose cutânea difusa (LCD).

A LC é a forma mais comum, caracterizada pela presença de lesões exclusivamente na pele, que se iniciam no ponto de inoculação dos promastigotas infectantes, através da picada do vetor. A lesão surge após um período de incubação variável de 10 dias a três meses, apresenta uma pápula eritematosa que progride lentamente para nódulo, acompanhada de adenopatia regional, com ou sem linfangite, em 12 a 30% dos casos. Geralmente as lesões evoluem para a cicatrização (Gontijo & Carvalho, 2003). A LC é causada por *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. panamensis* nas Américas e *L. major* e *L. tropica* nos outros países (David & Craft, 2009 ; Marzochi et al., 1992).

A incapacidade de montar uma resposta imune celular eficaz na LC está associada à evolução clínica e resposta terapêutica menos favoráveis para o paciente. Em pacientes com a síndrome de imunodeficiência adquirida, a LC pode apresentar quadros clínicos atípicos, podendo ocorrer disseminação e má resposta ao tratamento (Ministério da Saúde, 2007).

A LC se subdivide em leishmaniose localizada (LCL), disseminada (LCDiss) e LC recidivante. A LCL apresenta uma lesão típica de úlcera cutânea com borda elevada, fundo granuloso limpo ou com pouca secreção. As lesões são geralmente únicas ou em pequeno número acometendo uma região do corpo, afetam normalmente áreas expostas, principalmente os

membros, mas podem ser observadas em qualquer outra região. Essa forma é extremamente difundida no Velho Mundo, causada pelo parasito *L. major* (Marzochi et al., 1992; Grevelink et al., 1996).

A LCDiss é caracterizada pela presença de numerosas lesões papulosas, ulceradas ou acneiformes distribuídas pelo corpo, normalmente essa forma é encontrada em indivíduos do sexo masculino. Os agentes etiológicos são *L. braziliensis*, *L. amazonensis* ou *L. guyanensis*, a multiplicidade de lesões deve-se à disseminação hematogênica dos parasitos (Carvalho et al., 2000).

A LC recidivante é caracterizada como a forma recidiva da LC, geralmente se inicia na borda de cicatriz de lesão ulcerada anteriormente. Foi originalmente descrita na LC do Velho Mundo, mas ocorre também no continente americano (Berlin C, 1940). A recidiva surge geralmente dentro de um ano após a cura da doença inicial (Saravia et al., 1990).

A LM é caracterizada pela habilidade do parasito de produzir metástases na mucosa do indivíduo afetado, através da disseminação hematogênica ou linfática. As lesões são destrutivas, acometendo as mucosas do nariz, boca e orofaringe. A progressão clínica para a forma mucosa é dependente da combinação da imunidade celular mediada pelo hospedeiro e virulência do parasito. Embora haja relatos de lesões mucosas relacionadas a infecções com *L. amazonensis*, *L. major*, *L. tropica* e *L. infantum*, a LM clássica é associada ao subgênero *Viannia*, mais frequentemente a *L. braziliensis*, mas também a *L. panamensis* e *L. guyanensis* (Reithinger et al., 2007; David & Craft, 2009; Marzochi et al., 1992). A LM clássica, secundária, é considerada o pólo hiperérgico da LTA, pois esta forma clínica apresenta uma forte resposta celular do tipo 1 com uma grande quantidade de citocinas próinflamatórias como IFN- γ (interferon- γ) e TNF- α que promovem a ativação de macrófagos juntamente com o controle da multiplicação intracelular dos parasitos. Associada a essa resposta, há uma diminuição da produção de IL-10 (interleucina-10), uma citocina capaz de modular a resposta próinflamatória e inibir a ativação de macrófagos (Bacellar et al., 2002). Faria e colaboradores (2005) demonstraram que pacientes com LM expressam menores quantidades do receptor de IL-10, o que pode ser um possível mecanismo pelo qual ocorre a exacerbação da resposta *in situ* na LM.

A LCD é considerada rara até nos países onde a leishmaniose é endêmica. No Brasil possui como agente único a *L. amazonensis*. Esta é a forma clínica anérgica da LTA, com deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*, enquanto a resposta imune a outros patógenos intracelulares permanece intacta. Caracteriza-se pela presença de nódulos, placas infiltradas, sem ulceração das lesões ou acometimento mucoso. As lesões

costumam ser amplamente distribuídas pela superfície corporal e ricas em parasitos. Na ausência de uma resposta imune celular efetiva contra o parasito, ocorre intensa multiplicação, aumentando o número de lesões e expandindo sua distribuição. O teste cutâneo de Montenegro é caracteristicamente negativo. Na forma difusa há uma resposta de citocinas predominante do tipo 2 (David & Craft, 2009; Azeredo-Coutinho RBG, 2008).

1.3 *Leishmania amazonensis*

A *Leishmania amazonensis* é uma espécie pertencente ao antigo complexo mexicana (Lainson & Shaw, 1979), subgênero *Leishmania*, é um importante agente etiológico da leishmaniose tegumentar humana, apresentando um amplo espectro de doenças clínicas (Barral et al., 1991).

Essa espécie foi originalmente descrita na Região Amazônica brasileira, sua distribuição geográfica engloba América Central e Regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, principalmente nas florestas úmidas da Bacia, em áreas de florestas primárias e secundárias tipo várzea e igapó (Marzochi et al., 1992; Osorio y Fortea et al., 2007). Azeredo-Coutinho e colaboradores (2007) demonstraram que essa espécie está aumentando sua distribuição geográfica no Brasil, adquirindo novas áreas de transmissão, como o Estado do Rio de Janeiro.

Ao que se sabe, a perpetuação da *L. amazonensis* no ecossistema natural baseia-se principalmente na *Lutzomyia flaviscutellata*, um flebotomíneo de hábito noturno e pouco antropofílico, e *Lu. olmeca nociva* como vetor secundário no Amazonas e em Rondônia. Na Amazônia, o principal hospedeiro silvestre é o roedor *Proechimys sp.* (rato-soiá), além de outros roedores: *Oryzomys sp.*, *Neacomys sp.*, *Nectomys sp.* e *Dasyprocta sp.*, os marsupiais *Metachirus sp.*, *Philander sp.*, *Didelphis sp.* e *Marmosa sp.* e a raposa *Cerdocyon thous* (Desjeux P, 2001; Basano AS, 2004).

Na maioria das vezes, os mamíferos silvestres são hospedeiros do parasito mesmo na ausência de qualquer lesão cutânea detectável. Quando os humanos entram nas áreas de floresta, podem ser tornar hospedeiros acidentais de *L. amazonensis*, podendo ou não exibir as lesões cutâneas no sítio de inoculação do parasito. (Osorio y Fortea et al., 2007).

A *L. amazonensis* é o único agente etiológico da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil, porém um grande espectro de resposta do hospedeiro tem sido observado nos humanos, pois há relato de que esta espécie também pode causar todas as outras formas clínicas da doença

(leishmaniose cutânea, mucosa e visceral) (Barral et al., 1991). As lesões de pacientes com LC causada por *L. amazonensis* são caracterizadas por grande infiltrado inflamatório na borda das lesões, diferindo das lesões causadas por outros agentes como a *L.(V.) braziliensis* (Silveira et al., 2009).

As espécies do subgênero *Leishmania*, como a *L. amazonensis*, inibem a resposta imune proinflamatória parasiticida do tipo 1. Essa é uma característica evidenciada na leishmaniose cutânea difusa, na qual as lesões nodulares ou em placa na pele se disseminam por todo o corpo, associadas com alta produção de interleucina-4 (IL-4), dessa forma o controle da infecção através da resposta de células T é ineficiente, além de apresentar uma pobre resposta aos tratamentos tradicionais com antimoniais (Barral et al., 1995; Silveira et al., 2009). A infecção por *L. amazonensis* também é caracterizada por estimular outras citocinas do tipo 2, como IL-10 e IL-13. Coelho e colaboradores (2010) demonstraram que a resposta imune *in vitro* inicial contra *L. amazonensis* é caracterizada por uma alta produção de IL-10 e IL-13, verificada através da estimulação de células mononucleares do sangue periférico obtidas de voluntários saudáveis. Na infecção causada por *L. amazonensis* no camundongo C57BL/6 foi observada produção de IL-10 por células T regulatórias (Ji et al., 2005).

No modelo murino, o curso das lesões cutâneas causadas por *L. amazonensis* difere marcadamente entre as várias cepas de camundongos. O BALB/c é altamente suscetível ao desenvolvimento de lesões crônicas características de *L. amazonensis*, já o C57BL/10 desenvolve lesões crônicas com persistência da carga parasitária. Em contraste, as cepas C3H, C57BL/6, DBA, e CBA são menos suscetíveis à infecção por parasitos desta espécie, apresentando desenvolvimento lento das lesões, mas com persistência da carga parasitária (Cardoso et al., 2010; Pereira et al., 2008).

Nos macrófagos, o desenvolvimento dos parasitos ocorre dentro de uma organela chamada de vacúolo parasitóforo (VPs). Embora todos os VPs do gênero *Leishmania* que foram estudados possuam muitas características em comum, nem todos são idênticos morfológica ou funcionalmente. O VP da espécie *L. amazonensis* é extremamente grande em relação às outras espécies. Além disso, enquanto espécies como *L. major* permanecem em pequenos vacúolos individuais, os amastigotas de *L. amazonensis* coabitam em um grande vacúolo comum. Possivelmente, há diferenças no processo de fusão/fissão que ocorre a nível dessas organelas, podendo acontecer em diferentes níveis nos macrófagos infectados com esta espécie (Osorio y Fortea et al., 2007; Antoine et al., 1998).

Os parasitos da espécie *L. amazonensis* apresentam uma alta capacidade de infectar macrófagos. Possivelmente é esta característica que permite que o parasito mantenha a infecção nas cepas de camundongos que são resistentes à infecção por outras espécies de *Leishmania* (Pereira et al., 2008). Esse parasito tem sido descrito como resistente à morte através do óxido nítrico (NO) produzido pelos macrófagos (Mukbel et al., 2007), além disso a *L. amazonensis* é capaz de inibir a produção de NO em macrófagos murinos, assim como a diminuição da atividade na iNOS (óxido nítrico sintase) (Balestieri et al., 2002).

As células dendríticas (CDs) são capazes de fagocitar os dois estágios evolutivos de *L. amazonensis*, independente da opsonização prévia com o componente C3 do sistema complemento ou anticorpos específicos, porém somente as CDs que fagocitaram os parasitos opsonizados via anticorpos entram no processo de maturação. A colonização das CDs por parasitos de *L. amazonensis* não-opsonizados é, portanto, um benefício para o parasito. Desta forma, ele será capaz de estabelecer e amplificar a infecção, antes da instalação da resposta imune adaptativa (Prina et al., 2004).

1.4. Definição de virulência

O termo virulência compreende fatores microbiológicos, patológicos, ecológicos e evolucionários, com uma complexidade intrínseca ao organismo em questão, considerada como a habilidade do patógeno em causar doença (Casadeval et al., 1999). Chang KP e colaboradores (2003) definiram virulência como o grau de patogenicidade de um microorganismo que possuía geneticamente essa capacidade, que é manifestada contra um hospedeiro com o sistema imune eficiente sob condições normais.

A definição de virulência é mais complexa para patógenos que causam infecções a longo prazo, como o caso do protozoário *Leishmania* que reside no interior do macrófago, já que esta célula é uma peça chave na regulação do sistema imune do hospedeiro. Na infecção humana, a virulência desses parasitos é manifestada por sua habilidade de produzir diferentes sintomas clínicos, variando de lesões cutâneas que se curam espontaneamente a uma doença visceral potencialmente fatal. Embora a virulência de *Leishmania* possa ser modulada por fatores ambientais e genéticos relacionados aos hospedeiros mamíferos e vetores, os determinantes moleculares são elementos chave no estabelecimento da infecção, ou seja, são os fatores que determinam a virulência (Rivas et al., 2004).

Chang & Mgwire (2002) estabeleceram um modelo dividindo os determinantes moleculares de virulência em dois tipos: um grupo de moléculas invasivas/evasivas que estão envolvidas no estabelecimento da infecção e sobrevivência, estas são proteínas de superfícies ou moléculas secretadas. No caso do protozoário *Leishmania*, essas moléculas atuam na infecção do macrófago, ajudando a estabelecer o parasitismo intracelular. O segundo grupo consiste de moléculas intracelulares chamadas de “patoantígenos”, as quais estão envolvidas na patologia da doença.

No contexto deste modelo, o conceito de virulência engloba dois eventos separados: a infecção mantida pela replicação do parasito e a patologia baseada na resposta imune (Chang et al., 2003; Chang & Mgwire, 2002).

1.5. Fatores que determinam a virulência em *Leishmania*

O sucesso do ciclo biológico de *Leishmania* sp. é dependente de genes que são diferencialmente expressos entre os hospedeiros mamíferos e invertebrados, esses genes codificam proteínas implicadas nas interações parasito-hospedeiro e sobrevivência – fatores de virulência (Peacock et al., 2007).

A hipótese mais aceita é que os parasitos do gênero *Leishmania* possuam um repertório de genes que são “ligados” e “desligados” durante a transição de um ambiente para outro. Alguns produtos desses genes podem predispor a *Leishmania* a sobreviver no ambiente em transição. Já outros produtos podem estar envolvidos na evasão do sistema imune e na capacidade de multiplicação sob condições extremas (Chang et al., 1999).

De acordo com o Postulado de Koch, para que um gene ou molécula seja considerado um “gene de virulência”, essa molécula deve estar relacionada de alguma forma com a patogenicidade ou infectividade, a inativação do gene deve levar à perda significativa da virulência e a restauração funcional do gene deve recuperar a patogenicidade integralmente (Casadeval et al., 1999)

Dentre as moléculas consideradas como fatores de virulência no gênero *Leishmania* está a MSP (major surface protein), alternativamente chamada de leishmanolisina, ou GP63, devido ao seu peso molecular de 63 kDa. A GP63 é a glicoproteína de superfície mais abundante nas formas promastigotas do parasito *Leishmania*, cada célula possui aproximadamente 5×10^5 moléculas. Também está presente na forma amastigota (Yao et al., 2003). Essa proteína é uma ecto-metaloprotease que além de estar ricamente presente na membrana celular dos promastigotas,

também é secretada por essas formas evolutivas (Chang & Mcgwire, 2002). A riqueza da GP63 na superfície celular de *Leishmania* tem sido correlacionada com a virulência do parasito, pois esta molécula participa de várias etapas do início da infecção pelos promastigotas. Estas etapas incluem: resistência à lise mediada pelo complemento (pois processa o C3 enzimaticamente, convertendo o produto da quebra C3b na sua forma inativa C3bi), ligação e internalização dos parasitos pelos macrófagos (através dos receptores de superfície dos macrófagos) e sobrevivência intracelular dos parasitos fagocitados (proteção dos conteúdos liposomais da degradação) (Yao et al., 2003; Ramamoorth et al., 1991).

Durante o seu desenvolvimento no hospedeiro invertebrado, as formas promastigotas passam por modificações morfológicas, bioquímicas e também das características relacionadas à virulência, pois evoluem para uma forma altamente infectiva para o hospedeiro vertebrado. Similarmente, durante o cultivo *in vitro*, os promastigotas evoluem de uma forma menos virulenta e com alta capacidade replicativa (promastigotas de fase log) para uma forma altamente virulenta, encontrada durante a fase estacionária do crescimento, o promastigota metacíclico. Esse processo de desenvolvimento mimetiza os acontecimentos que ocorrem no intestino do vetor. Há uma regulação positiva da expressão da glicoproteína GP63 durante a metaciclogênese, ou seja, sua expressão é maior nos promastigotas altamente virulentos (promastigotas metacíclicas) do que nos promastigotas de fase log, como verificado em *Leishmania chagasi*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania braziliensis* (Brittingham et al., 2000; Ramamoorth et al., 1991; Murray et al., 1990).

As cisteino-proteinases (CPs) são enzimas que são consideradas como fatores de virulência em *Leishmania spp.*, pois exercem funções essenciais na interação parasito-hospedeiro. Nas formas amastigotas, as CPs são associadas diretamente com a patogenia da leishmaniose, agindo diretamente nos processos que são essenciais para o estabelecimento com sucesso da infecção, como a autofagia e diferenciação (Rebelo et al., 2010; Mottram et al., 2004).

As funções das CPs ainda não estão completamente elucidadas, porém acredita-se que a principal função dessas enzimas seja a clivagem catalítica das ligações peptídicas, provendo as necessidades nutricionais, sendo responsáveis também pelo processamento de outras proteínas em ambos os estágios morfológicos do parasito (Alves et al., 2001). Segundo Rebelo e colaboradores (2010), a expressão das CPs é modulada durante passagens sucessivas *in vitro* de promastigotas de fase estacionária de *L. (V.) braziliensis*, sugerindo que essas enzimas devem estar envolvidas com as mudanças adaptativas e seletivas durante o ciclo biológico do parasito.

O lipofosfoglicano (LPG) é um glicolípido bastante abundante (3 - 5×10^6 cópias por célula) presente na membrana celular de todas as formas promastigotas do gênero *Leishmania*, também é considerado com um fator de virulência devido à singularidade de sua estrutura, conservação e importância durante o ciclo biológico do parasito (Turco et al., 2001; Mcconville et al., 1992).

Durante o desenvolvimento sequencial das formas promastigotas de um estágio não infectivo ou estágio procíclico para o estágio metacíclico ou infectivo, ocorrem mudanças na estrutura desses promastigotas. As procíclicas possuem a capacidade de se ligar às células epiteliais do intestino médio, o qual permite que os parasitos permaneçam ligados às células intestinais mesmo durante a excreção do repasto sanguíneo que já foi digerido. Já as formas promastigotas metacíclicas perdem essa capacidade, de forma que elas possam migrar para a região anterior do Flebotomíneo e serem transmitidas durante o próximo repasto sanguíneo. As formas promastigotas metacíclicas são bem adaptadas tanto para a infecção como para a sobrevivência no hospedeiro vertebrado (Sacks et al., 1995).

O LPG está diretamente relacionado com os eventos que ocorrem durante o desenvolvimento das promastigotas no vetor. Durante a metaciclogênese, o LPG passa por modificações, que incluem o alongamento da molécula, através do dobramento do número de unidades de repetição fosforiladas. Muitas vezes, essas modificações são acompanhadas por substituições diferenciais ou perdas das cadeias laterais de repetição, que ocorre em *L. major*, *L. amazonensis* e *L. donovani*, podendo também ocorrer modificações e/ou exposição da estrutura do oligossacarídeo (*L. donovani*, *L. infantum*/ *L. chagasi*). Esse LPG modificado não é mais capaz de se ligar aos receptores presentes no intestino do vetor (Sacks et al., 1995; Mcconville et al., 1992; Ilg T 2001).

O alongamento do LPG controla a ativação do complemento, impedindo a inserção do complexo de ataque a membrana do sistema complemento (C5b-C9) à membrana celular do parasito. Enquanto os promastigotas estão residindo no trato digestivo do vetor, estão protegidos da ação de enzimas hidrolíticas através do glicocálice do LPG (Sacks et al., 1995; Ilg T, 2001). Além disso, as modificações do LPG são requeridas para a competência do vetor, pois o *Phlebotomus papatasi* só é permissivo a *L. major* devido a receptores específicos que reconhecem preferencialmente as cadeias laterais ricas em galactose, característica da molécula de LPG dessa espécie (Sacks et al., 1994).

A sobrevivência durante o estágio inicial de estabelecimento no macrófago é crítica para o parasito, pois é o seu estágio mais vulnerável. O LPG tem um papel central na ligação e captação

pelos macrófagos e na subsequente sobrevivência intracelular dos parasitos. Alguns autores sugerem que o LPG específico das formas promastigotas metacíclicas esteja diretamente relacionado com várias etapas do estabelecimento da infecção no hospedeiro mamífero, influenciando as vias de transdução de sinal do macrófago, retardando a fusão do lisossomo com o fagossomo, diminuindo a ativação dos sistemas de defesa do macrófago como a iNOs (óxido nítrico sintase induzível), inibindo a síntese de IL-12, reduzindo a migração entre os endotélios dos monócitos e suprimindo a expressão de IL-1 β (interleucina 1 beta) (Ilg T, 2001, Sacks et al 1995, Mcconville et al., 1992, Descoteaux A & Turco SJ, 1999) .

A sobrevivência tanto nos ambientes extra e intracelular depende do balanço entre a efetividade da resposta imune do hospedeiro e a habilidade do parasito em evadir os mecanismos de defesa, os fatores de virulência agem nos dois lados desse balanço (Ramamoorthy et al., 1992).

1.6. KMP-11

1.6.1. Histórico

A proteína KMP-11 “Kinetoplastid membrane protein-11” foi descoberta durante a avaliação do LPG como um potencial estimulador de células T. Mendonça e colaboradores (1991) demonstraram que a capacidade estimulatória do LPG para linfócitos T se devia a contaminantes protéicos presentes nas preparações do glicolípido. Este componente protéico foi purificado e caracterizado como “LPG-associated protein” (LPGAP) (Jardim et al., 1991).

KMP-11 é uma molécula composta por 92 aminoácidos, codificada por 276 bp (pares de bases), que corresponde a uma proteína de 11kDa. A sua atual denominação (KMP-11) é devido à presença dessa proteína de 11kDA na membrana de todos os protozoários da ordem Kinetoplastida, incluindo *Trypanosoma cruzi*, *Crithidia fasciculata*, *Leptomonas collosma* and *Phytomonas spp* (Stebeck et al., 1995; Jardim et al., 1995a).

A proteína KMP-11 é uma glicoproteína encontrada tanto nas formas amastigotas como nas promastigotas de *Leishmania* (Jardim et al., 1995a; Matos et al., 2010). A sequência de nucleotídeos da região que codifica a proteína KMP-11 mostrou alta homologia (>95%) entre as espécies de *Leishmania* das quais esse gene foi clonado (*L. infantum*, *L. donovani*, *L. panamensis*) (Ramirez et al., 1998). O locus gênico que codifica KMP-11 em *Leishmania sp* consiste de três cópias separadas por regiões intergênicas variáveis (Jardim et al., 1995b; Ramirez

et al., 1998). Essa molécula também apresenta alto grau de homologia na sequência de aminoácidos comparada aos outros kinetoplastídeos: 86,57 % (Sanchez-Arcila JC, 2010), mostrando que esta é uma das moléculas mais conservadas e abundantes ($1-2 \times 10^6$) na membrana dos kinetoplastídeos, com níveis comparados ao LPG e a GP63. (Jardim et al., 1995a; Jardim et al., 1995b).

Além de apresentar um alto nível de conservação intraespecífica, KMP-11 também apresenta conservação interespecífica. Tolson e colaboradores (1994) mostraram que os epítomos de células T da proteína KMP-11 são compartilhados entre as espécies *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. major*, *L. tropica*, *L. donovani*, *L. amazonensis* e *Trypanosoma congolense*. Stebeck e colaboradores (1995) mostraram que a proteína foi expressa em todo o ciclo de *T. congolense*, porém em menor nível das formas sanguíneas. Em *T. cruzi*, as epimastigotas expressam maiores níveis do que as trypomastigotas.

Além de estar presente em ambas as formas evolutivas de *Leishmania*, a expressão de KMP-11 é maior na forma amastigota do que na forma promastigota. Na espécie *L. amazonensis* sua expressão é regulada positivamente durante a metaciclogênese, ou seja, há maior expressão da proteína nas formas promastigotas metacíclicas (promastigotas não replicativas altamente infectivas) do que nas de fase log (promastigotas altamente replicativas sem capacidade infectiva) (Matos et al., 2010).

Análises físico-químicas da proteína KMP-11 mostraram que ela possui um componente anfipático, apresentando superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas, supostamente essa característica facilita a forte interação com bicamadas lipídicas (Jardim et al., 1995b).

Nas espécies *L. infantum* e *Trypanosoma rodesiense*, a KMP-11 foi localizada principalmente em volta do flagelo e na bolsa flagelar das formas promastigotas (Stebeck et al., 1995), assim como na *L. amazonensis*, pois nesta espécie a proteína foi localizada tanto no bolso flagelar, como na membrana plasmática do parasito e associada com estruturas das vesículas intracelulares da forma promastigota, já no amastigota ela foi encontrada na superfície da membrana plasmática, na membrana plasmática do bolso flagelar e em vesículas intracelulares (Matos et al., 2010).

Essa proteína exerce um papel na imunologia da leishmaniose e tem sido utilizada em experimentos de imunoproteção como um candidato em potencial à vacina para leishmaniose (Jardim et al., 1995a; Ramírez et al., 2001; Bhaumik et al., 2009; Basu et al., 2005).

1.6.2. Possíveis funções

A função dessa proteína foi relacionada com a estabilização da membrana, baseando-se no grau de similaridade entre KMP-11 e os domínios anfipáticos das apolipoproteínas (Berberich et al., 1997). As apolipoproteínas bovinas A-I e A-IV foram descobertas como homólogas a KMP-11. A apolipoproteína I é o principal componente do complexo de lipoproteínas que transporta o colesterol de alta densidade, essa proteína preenche os espaços entre as junções formadas pelos grupos de fosfolípídeos e colesterol na membrana. Já a apolipoproteína IV foi menos estudada. Essas duas lipoproteínas possuem uma característica estrutural em comum: um segmento de 22 aminoácidos que se repete seis vezes, possuindo uma forte tendência para a formação de estruturas anfipáticas em α hélice, semelhantes àquelas previstas para KMP-11 (Jardim et al., 1995b).

Em *L. donovani*, KMP-11 parece estar envolvida na estabilização do LPG na membrana do parasito, regulando a pressão da bicamada lipídica através de uma suposta associação com o LPG (Stebeck et al., 1996).

Pensa-se que a monometilarginina presente na posição 45 da sequência de KMP-11 em *L. donovani* possa estar envolvida nos mecanismos de defesa do parasito após a degradação parcial da proteína no vacúolo parasitóforo (Jardim et al., 1995a). Esse resíduo de arginina modificado é conhecido como um inibidor competitivo da óxido nítrico sintase, uma enzima central envolvida na geração de radicais de óxido nítrico dentro dos macrófagos ativados (Liew et al., 1990). Foi proposto que dentro das fortes condições hidrolíticas do fagolisossomo, a KMP-11 seria liberada pelo parasito e degradada em aminoácidos pelas enzimas proteolíticas. Subsequentemente, a monometilarginina iria contribuir para inibição da enzima e sobrevivência do parasito dentro do fagolisossomo (Ramírez et al., 1998).

A análise da antigenicidade da proteína recombinante de KMP-11 de *L. panamensis* nos soros de pacientes com LC, LCM e LV sugere que esta proteína aja como um potente estimulador de células B durante o curso natural da infecção (Ramírez et al., 1998). Na leishmaniose visceral canina, essa proteína também age como um potente imunógeno de células B (Berberich et al., 1997). A KMP-11 também foi identificada como um potente estimulador da proliferação de células T, atuando na indução de resposta imune adquirida (Tolson et al., 1994; Jardim et al., 1991; Ramirez et al., 2001; Delgado et al., 2003; Russo et al., 1992).

1.6.3. KMP-11 como fator de virulência

KMP-11 induz fortemente a produção de IL-10 em células humanas, tanto de pacientes com leishmaniose tegumentar americana, controles sadios e indivíduos portadores de infecção assintomática por *L. chagasi* (de Carvalho et al., 2003). A IL-10 é a principal citocina reguladora da resposta inflamatória, agindo diretamente na inibição da resposta imune do tipo 1. Esta resposta é caracterizada pela produção de citocinas proinflamatórias e ativação de macrófagos. Nas doenças causadas por parasitos intracelulares como a leishmaniose, a alta produção de IL-10 pode ser danosa para o hospedeiro, devido à sua habilidade de desativar a resposta do tipo 1, permitindo a multiplicação dos parasitos (Bazzoni et al 2009). Na leishmaniose cutânea, a produção de IL-10 está associada com progressão da lesão, mediando a suscetibilidade e patogênese tanto na LC como na LV (Padigel et al 2003). A IL-10 produzida por células T regulatórias contribuem diretamente para a persistência parasitária, tanto pela modulação das células apresentadoras de antígeno como pela inibição da produção de citocinas pelos linfócitos T helper do tipo 1 (Belkaid et al., 2002).

A produção de IL-10 estimulada pela KMP-11 indica que esta proteína possa desempenhar um papel protetor para o parasito no hospedeiro mamífero e estar, portanto, associada à sua virulência, sendo importante na regulação da reação inflamatória crônica, além de inibir os mecanismos responsáveis pela destruição dos amastigotas intracelulares.

Mukhopadhyay e colaboradores (1998) mostraram que o nível de expressão de KMP-11 e LPG de *Leishmania donovani* a nível de RNA diminui com o tempo de cultura (número de passagens) do parasito, assim como a virulência das formas promastigotas que foram mantidas em cultura a longo prazo, verificado através da infecção *in vitro* de macrófagos murinos. O autor sugere que a associação entre a perda de virulência do parasito e a diminuição da expressão de KMP-11 e LPG de forma sincronizada, pode ser indicativa de um papel para LPG e KMP-11 na infectividade de promastigotas de *Leishmania donovani*.

Portanto, este trabalho visa avaliar da expressão de KMP-11 de *L. amazonensis* ao nível de RNA e de proteína durante passagens sucessivas de promastigotas de fase estacionária através de cultivo *in vitro*, assim como associar a expressão com a virulência dos parasitos, através da infecção *in vivo* de camundongos BALB-c, quantificação da carga parasitária e infecção *in vitro* de macrófagos murinos. Desta forma, buscamos contribuir para a caracterização da KMP-11 como um fator de virulência em *Leishmania amazonensis*.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a evolução da expressão do gene de KMP-11 de *L. amazonensis* ao nível de RNA e de proteína durante passagens sucessivas de promastigotas de fase estacionária através de cultivo *in vitro*, investigando se há associação entre a sua expressão e a virulência dos parasitos.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão da proteína e do mRNA de KMP-11 ao longo de passagens sucessivas de promastigotas cultivadas *in vitro*
- Verificar a virulência das diferentes subculturas de promastigotas em modelos de infecção *in vivo* e *in vitro*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Ética e biossegurança

Os protocolos utilizados neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz (Protocolo L-0012/07). O projeto do orientador ao qual o presente projeto de mestrado é vinculado, conta com o Certificado de Qualidade em Biossegurança 1.333/2008 (D.O.U. 24 de abril de 2008).

3.2. Parasitos

As formas promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram obtidas por diferenciação dos amastigotas extraídas de lesão de camundongos BALB/c infectados com estas cepas.

3.3. Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos BALB/c susceptíveis à *L. amazonensis*, fêmeas, com cerca de cinco semanas de vida e livres de patógenos específicos (“specific pathogen free” - SPF). Estes camundongos foram gerados no Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fiocruz, a partir de colônias de expansão e criação de animais SPF.

3.4. Culturas de promastigotas de *L. amazonensis*.

As formas promastigotas de *L. amazonensis* IFLA/BR/67/PH8, foram cultivadas em meio Schneider (Gibco) com penicilina 200 UI/mL, estreptomicina 200 mg/mL, 0,5 mL de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma) inativado pelo calor, até atingirem a fase estacionária de crescimento. As formas promastigotas foram coletadas para análise durante a fase estacionária (5º dia de cultura), nas culturas de 1ª, 5ª, 10ª e 20ª passagens;

3.5. Determinação da proporção de promastigotas metacíclicas na fase estacionária

A determinação das formas promastigotas metacíclicas foi realizada através do teste de lise pelo complemento. Os promastigotas obtidas de fase estacionária de crescimento foram lavadas em tampão fosfato (PBS) ($3 \times 2000 \times g$, 10min, 4°C) e mantidas no gelo. Após contagem em câmara de Neubauer (BOECO, Alemanha), as preparações foram ajustadas para 10^7 /mL. Em seguida, foi realizada a adição do complemento a 10%. Após 1 h de incubação em banho maria (37°C), a reação da lise é interrompida, seguida de mais três centrifugações para a total retirada do complemento. Após nova contagem na câmara de Neubauer utilizando-se o azul de trypan como corante vital, o número de parasitas resistentes ao complemento (teste/control) foram estimados, determinando-se o percentual de formas metacíclicas (Cysne-Finkelstein *et al.*, 1998).

3.6. Preparação do extrato total de promastigotas

As culturas foram lavadas por três vezes com PBS estéril ($900 \times g$, 10 minutos, 20°C) por, seguido da contagem na câmara de Neubauer onde o volume foi ajustado para 5×10^6 parasitos/mL. O extrato foi ressuspenso em 0.5mL de solução estabilizadora de RNA (RNA later/ Applied biosystems). Os extratos foram armazenados em tubos de criopreservação e mantidos na temperatura de -70°C até o momento de uso.

3.7. Isolamento e purificação do RNA total

Os promastigotas que estavam na solução de RNA later (Ambion) (5×10^6 células/mL) foram coletadas e centrifugadas a $500 \times g$ por 10 minutos, onde o sobrenadante foi descartado. O isolamento e purificação do RNA foi realizado com o Kit RNA Isolation System (Promega), que adicionalmente realiza tratamento com a enzima DNase I, seguindo as instruções do fabricante. As amostras de RNA de cada passagem foram quantificadas por um espectrofotômetro NanoDrop (ND – 1000, NANO Drop Technologies), que apresenta a capacidade de analisar 1µl de amostra com alta precisão e reprodutibilidade.

3.8. Análise qualitativa de RNA total

A análise qualitativa foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) desnaturante (agarose ultra pura/ MOPS 10x “3-(N-morpholino)propanesulfonic acid” / água RNase free). As amostras foram diluídas no tampão mix de amostra (Formamida 70%, MOPS 2X, corante bromofenol blue 0,03%) e corante SYBR Green II, que revela a presença do RNA e aplicadas no gel com ddp 100 v por 40 minutos. Após a corrida eletroforética, o gel é analisado em um sistema de fotodocumentação (L-Pix Touch, Loccus Biotecnologia).

3.9 Desenho dos iniciadores oligonucleotídeos específicos

Os iniciadores utilizados foram desenhados a partir do programa Primer3 disponível no site http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi. Os dois pares de oligonucleotídeos iniciadores (Applied Biosystems) foram desenhados a partir da sequência de nucleotídeos da proteína KMP-11 de *L. amazonensis* registrada no GenBank com o código AF193432.1 e da proteína Beta-tubulina de *L. mexicana*, registrada no GenBank com o código AF345947.1, a última foi utilizada como controle normalizador da reação.

Tabela 3.1: Oligonucleotídeos utilizados para *L. amazonensis*

Oligonucleotídeos Iniciadores específicos	Sequências
1 KMP-11 (senso)	5' TTCCGGTTGAACTCCTCATC3'
2 KMP-11 (anti-senso)	5' AGTATTCCCCCGCTCTCATT3'
3 Beta-tubulina (senso)	5' GTTCTGCTCCTGCATCTTCC3'
4 Beta-tubulina (anti-senso)	5'AGTATTCCCCCGCTCTCATT3'

3.10. Síntese de cDNA

A partir do RNA total isolado do extrato de promastigotas foi realizada a síntese de cDNA, através da reação de transcrição reversa (RT). A reação foi realizada incubando-se 500ng de RNA total com 0,5ug do iniciador complementar à cauda poli A (oligo dT), 1μl de dNTP 2,5mM e água RNase free (65°C, 5 minutos), seguido de bloqueio no gelo por 1 minuto. Logo após, foram adicionadas 1μl de DTT 100mM, 4μl do tampão 5x, 200U da enzima transcriptase Superscript III e 40U da enzima RNase out (inibidor de RNase). As amostras foram incubadas por 1 hora a 42°C, onde a reação foi interrompida, seguida de outra incubação de 5 minutos a 90°C. Após a reação os volumes das preparações foram ajustados para 100μl e as amostras armazenadas em -20°C até o momento do uso.

3.11. PCR quantitativo (PCR em tempo real)

A análise da expressão do gene da proteína KMP-11 durante passagens sucessivas de promastigotas de fase estacionária através de cultivo *in vitro* foi realizada através da técnica de PCR em tempo real. Os ensaios foram realizados no equipamento *Step One Plus* (Applied Biosystems) utilizando o sistema *SYBR green I* (Applied Biosystems), cuja fluorescência é diretamente proporcional à formação do produto amplificado em dupla fita (um fluoróforo ligante estrutural do DNA dupla fita encaixando-se na curvatura maior). As reações foram preparadas em um volume final de 20μl nas seguintes condições: 0,5 μM de cada iniciador (Tabela 4.1), 10μl de 2X SYBR green Master Mix, 4μl de cDNA e 5μl de água pura e estéril (RNase free). As condições de ciclagem foram: um passo inicial de ativação de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificação de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 50°C, seguido de 1 ciclo para determinar a curva de dissociação de 15 segundos a 95°C, 20 segundos a 60°C, e submetido a um gradiente de temperatura de 60°C a 95°C) de 20 minutos de duração, com um passo final de 15 segundos a 95°C. Os controles negativos de todos os reagentes e sem material genético foram incluídos em todos os ensaios de PCR para verificação de contaminação ou reações não específicas. A partir dos dados de acúmulo de fluorescência das triplicatas da reação de RT-PCR em tempo real de cada amostra, utilizou-se o ajuste de função logística, ou curva sigmóide, de quatro parâmetros para representar cada curva de amplificação, usando a biblioteca de funções qpcR (Ritz & Spiess, 2008) para a linguagem estatística R (R Development Core Team, 2009) versão 2.9.22. O ciclo de quantificação, ou C_q, foi determinado pelo ponto de interseção entre a

curva sigmóide ajustada e uma linha perpendicular ao ponto de máxima da segunda derivada dessa curva (ponto característico, ou crossing point; Cp). A eficiência de cada reação de amplificação foi calculada como a razão entre a fluorescência do ciclo de quantificação e a fluorescência do ciclo imediatamente anterior a esse. A eficiência estimada de cada gene, β -tubulina ou KMP-11, foi obtida pela eficiência média das eficiências calculadas para cada reação de amplificação daquele gene. As comparações de médias dos valores de expressão normalizados entre os grupos foram realizadas por ANOVA *one-way* não paramétrica via permutação ($n=1000$) irrestrita (Basso et al., 2009). As comparações de médias realizadas foram representadas em gráficos contendo os níveis de expressão normalizados de cada grupo pela média \pm erro padrão da média. Níveis de significância bi-caudais menores ou iguais a 0,01, 0,05 e 0,1 foram considerados como “altamente significantes”, “significantes” e “sugestivos”, respectivamente. O gene β -tubulina foi empregado como normalizador.

3.12. Análise por citometria de fluxo

Para a análise citofluorimétrica foram utilizadas promastigotas de fase estacionária das 1^a, 5^a, 10^a, 20^a passagens, essas células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS pH 7,4, seguido de contagem na câmara de Neubauer, o número de parasitos foi ajustado para 1×10^6 /mL. Logo após as células foram centrifugadas (2000 RPM /10 minutos), seguida da marcação através da adição de 100 μ l/tubo com anticorpo primário anti-KMP-11 (CLP004A, Cedarlane, Canadá) diluído 1:100 em tampão FACS SAP (PBS + 5% FCS+ 0,01% azida sódica + 0,05% de Saponina) e incubadas por 1 hora no gelo. Posteriormente as células foram lavadas com 100 μ l/tubo de tampão FACS (PBS + 5% FCS+ 0,01% azida sódica) e centrifugadas novamente (2000 RPM /10 minutos). Em seguida, foi realizada a marcação com 100 μ l da solução de anticorpo secundário (anti IgG murino conjugado com PE -ficoeritrina) diluído 1:10 em tampão FACS SAP. As promastigotas foram incubadas por 30 minutos no gelo protegido da luz. Após a incubação, as células foram lavadas com de tampão FACS (100 μ l/tubo) e centrifugadas (2000 RPM/10 minutos), o pellet foi reconstituído com 500 μ l/tubo de paraformaldeído 2% (Sigma). Os parasitos também foram incubados com anticorpo isotipo controle (CLCMG100, Cedarlane, Canadá), que atua como o controle negativo. A análise citofluorimétrica foi realizada no equipamento FACSCalibur (BD Biosciences), utilizando-se o software Summit v4.3 (DAKO). Tanto as porcentagens de células positivas quanto a intensidade da fluorescência foram obtidas. Os resultados foram expressos pela intensidade média de fluorescência.

3.13. Avaliação da virulência das formas promastigotas de fase estacionária de culturas com diferentes números de passagens *in vitro*

3.13.1. Infecção *in vivo*

A infecção experimental foi realizada em quatro grupos diferentes com 10 camundongos BALB/c cada grupo, utilizando os promastigotas de fase estacionária de 1^a, 5^a, 10^a, 20^a passagens. As culturas foram lavadas com meio Schneider e centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos, seguidas de três lavagens com PBS estéril, 3000 rpm/6 minutos cada uma. O sedimento foi ressuspenso em PBS seguido de contagem em câmara de Neubauer utilizando como corante vital o azul de Trypan (SIGMA) a 0,1% em PBS. A infecção foi realizada no coxim plantar esquerdo, em uma concentração de 1×10^7 promastigotas em 0,05mL de PBS estéril. A análise da progressão do volume da lesão foi monitorada através da medida semanal do aumento do diâmetro da pata infectada com um paquímetro durante dez semanas consecutivas, em comparação com a pata contralateral, segundo o descrito por Silva et al., 1994. A avaliação da virulência também foi monitorada através do surgimento de ulcerações nos grupos de camundongos infectados com as diferentes passagens.

3.13.2. Infecção *in vitro*

Macrófagos de camundongos BALB/c foram obtidos a partir do lavado peritoneal com 5mL de meio RPMI (Gibco), suplementado com 200UI/mL de penicilina, 200µg/mL de estreptomicina, 1mM piruvato de sódio, 1mM de L-glutamina e 1M de tampão HEPES (Sigma), mantido em banho de gelo. O lavado peritoneal dos animais foi centrifugado a 1800g por 10 min/4°C, em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em meio RPMI, contendo 10% de SFB. As células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando como corante vital o azul de Tripan a 0,1% em PBS (Sigma), sendo ajustadas para uma concentração de $2-4 \times 10^5$ / mL. O cultivo das mesmas foi feito em placas de cultura LAB-TEK II (Nalge Nunc International), utilizando atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após um período de 24 horas, as placas de cultura foram lavadas com PBS a 37°C para retirar as células não aderentes. Estes macrófagos foram infectados com promastigotas de fase estacionária na proporção de 1:0,25 (determinada através de experimentos prévios), em meio contendo 1% de SFB a 37°C/5% de CO₂. Após quatro horas, a placa foi lavada para retirar os parasitos não interiorizados e incubada

com meio RPMI contendo 10% de SFB. Após 24 horas as lamínulas foram lavadas por 3 vezes em PBS a 37°C e fixadas em metanol por 3 min. A coloração foi realizada posteriormente com o kit INSTANT PROV (Newprov), sendo realizada a quantificação da infecção através da microscopia ótica. Os resultados foram expressos em porcentagem média de macrófagos infectados e quantidade média de amastigotas por 100 macrófagos.

3.13.3. Quantificação da carga parasitária

A quantificação da carga parasitária foi realizada pelo método de análise de diluição limitante, como descrita por Titus et al. (1985), com algumas modificações como o uso do Schneider como meio de cultura, que já havia sido utilizado pelo nosso grupo e mostrou-se eficiente para a técnica da diluição limitante com *L. amazonensis* (Silva et al., 1994). A técnica foi realizada com as patas infectadas e os linfonodos de drenagem (poplíteos) dos grupos de animais infectados com as 1^a, 5^a e 10^a passagens, na 6^a semana após a infecção. Após eutanásia dos animais utilizando uma câmara de CO₂, foram removidos a pele e os dedos das patas infectadas de forma asséptica, assim como o linfonodo poplíteo. A pata retirada e o linfonodo foram pesados separadamente, em seguida os tecidos foram triturados e homogeneizados em homogeneizadores de vidro vigorosamente por alguns minutos em 5mL de meio Schneider suplementado com L-glutamina (1,5mM), penicilina (200UI/mL), estreptomicina (200µl/mL) e 20% de SFB até serem completamente macerados. Logo após, a suspensão foi mantida no gelo para sedimentação durante 5 minutos e o sobrenadante foi coletado. As diluições foram realizadas em placas de 24 poços, o primeiro poço foi preenchido com 2,5mL do sobrenadante da solução mantida em gelo onde, nos poços seguintes foi realizada uma diluição 1/10, (0,25mL em 2,5mL volume final). Cada diluição da placa de 24 poços foi distribuída em 2 colunas de placas de 96 poços, fundo chato (NUNC), 100µl/poço, em um total de 16 poços utilizados para cada diluição. Como controle da eficiência do plaqueamento, foi realizada a mesma diluição com uma suspensão contendo 1×10⁶/mL de promastigotas de fase log de *L. amazonensis* em primeira passagem após isolamento. As placas contendo as diluições dos tecidos das patas e a placa controle foram depois incubadas à 27°C em estufa BOD (FANEM). Após sete dias de incubação, foi realizada a leitura das placas em microscópio invertido (ZEISS – AXIOVERT 25) e os poços que continham parasitos vivos foram marcados (Silva et al., 1994).

3.14. Análise estatística

As análises estatísticas dos experimentos de medição de pata foram realizadas no programa Graph Pad Prism 5.0, utilizando o teste não paramétrico ANOVA 2 fatores, seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Curva de crescimento de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8)

Foi realizada uma curva de cinética do crescimento da cepa (IFLA/BR/67/PH8) de *L. amazonensis*, com um inóculo inicial de 10^5 promastigotas em fase logarítmica de crescimento, de modo a estabelecer o dia em que a cultura utilizada entraria em fase estacionária. De acordo com a curva de crescimento a fase estacionária é atingida no 5º dia. Então, em todos os experimentos posteriores, foram utilizadas promastigotas coletadas no quinto dia de cultura.

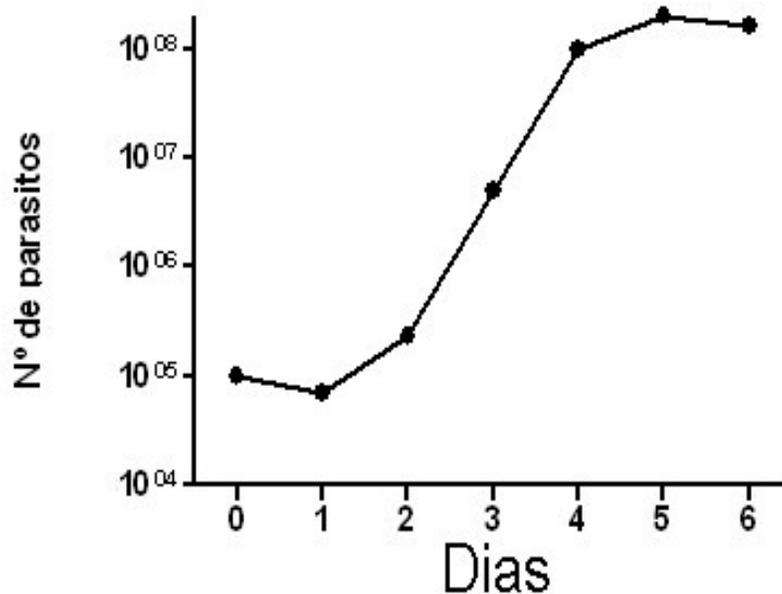


Figura 4.1. Curva de cinética do crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* da cepa (IFLA/BR/67/PH8), com um inóculo inicial de 10^5 promastigotas de fase logarítmica de crescimento, atingindo a fase estacionária no 5º dia. Os dados representam a média de dois experimentos independentes

4.2. Perda da virulência ao longo do cultivo *in vitro*

4.2.1. Infecção *in vivo*

Foi realizada a infecção em quatro grupos de 10 camundongos BALB/c com 1×10^7 promastigotas de fase estacionária de culturas de 1^a, 5^a, 10^a e 20^a passagens, em 0,05 mL de PBS estéril, por via subcutânea no coxim plantar esquerdo. O acompanhamento da progressão da lesão foi realizado durante um período de dez semanas. De acordo com os resultados mostrados na Figura 4.2, há um decréscimo da virulência das formas promastigotas de fase estacionária ao longo do número de passagens, pois os camundongos infectados com as passagens iniciais desenvolveram lesões maiores do que aqueles com os promastigotas mantidos em cultura por mais tempo.

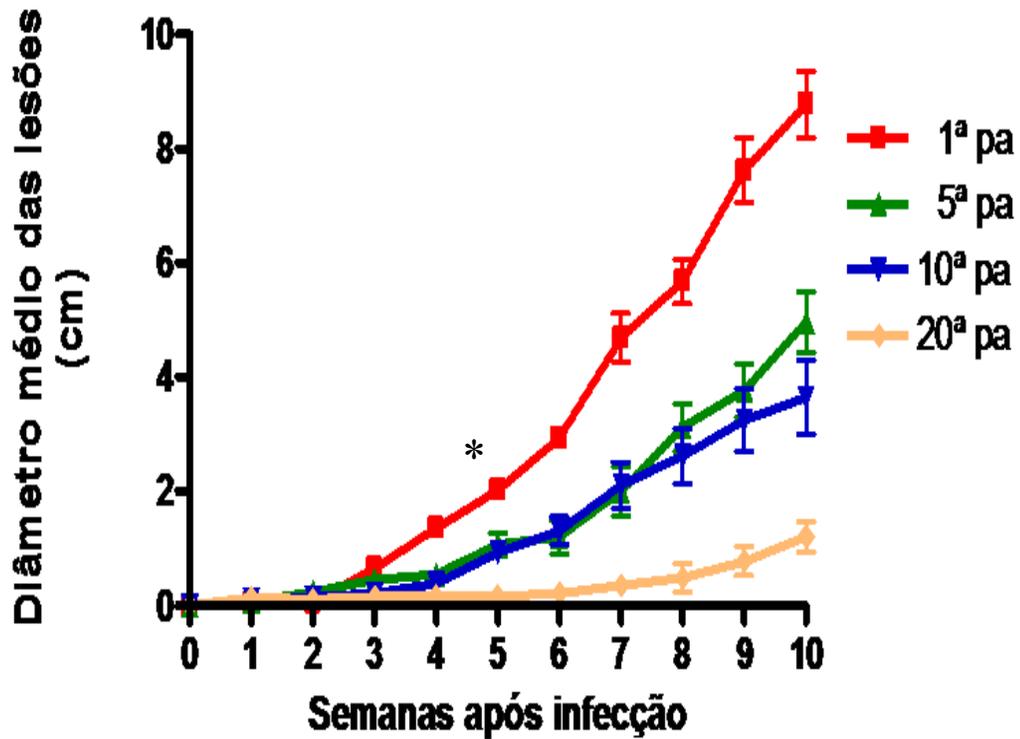


Figura 4.2. Progressão da lesão em camundongos infectados com 1×10^7 promastigotas de fase estacionária de diferentes subculturas em 0,05 mL de PBS estéril por via subcutânea no coxim plantar esquerdo. Os valores representam as médias dos diâmetros das patas infectadas descontados pelo diâmetro das patas contralaterais. Os dados representam as médias e \pm desvios padrão de dois experimentos realizados de forma independente. Em cada experimento foram utilizados 10 animais por grupo. O símbolo (*) representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos a partir da 5ª semana.

Os resultados de medição de pata foram analisados pelo teste não paramétrico ANOVA 2 fatores, seguido do pós-teste de Bonferroni (Tabela 4.1). Houve diferenças estatisticamente significativas entre as passagens na análise multigrupos (ANOVA): $p < 0,0001$.

Tabela 4.1. Comparação entre os resultados de medição de pata, provenientes dos desafios com as diferentes passagens de promastigotas de *L.amazonensis*, analisados pelo teste não paramétrico ANOVA 2 fatores, seguido do pós-teste de Bonferroni, demonstrando os valores de p para cada comparação entre os grupos e o período em que diferenças estatisticamente significantes foram encontradas.

Passagens analisadas	Período	Valor de p
1ª PA × 5ª PA	6ª a 10ª semana	$p < 0,001$
1ª PA × 10ª PA	5ª semana	$p < 0,05$
1ª PA × 10ª PA	6ª a 10ª semana	$p < 0,001$
1ª PA × 20ª PA	4ª semana	$p < 0,05$
1ª PA × 20ª PA	5ª a 10ª semana	$p < 0,001$
5ª PA × 10ª PA	10ª semana	$p < 0,001$
5ª PA × 20ª PA	7ª a 10ª semana	$p < 0,001$
10ª PA × 20ª PA	6ª semana	$p < 0,05$
10ª PA × 20ª PA	7ª a 10ª semana	$p < 0,001$

A perda da virulência foi verificada também pela diminuição da capacidade da infecção de produzir úlceras. Os resultados da Figura 4.3 demonstram que na 10ª semana pós-infecção 100% dos animais infectados com promastigotas de 1ª passagem apresentavam lesões ulceradas, enquanto que nenhum dos camundongos infectados com promastigotas de 20ª passagem apresentava ulceração nas lesões.

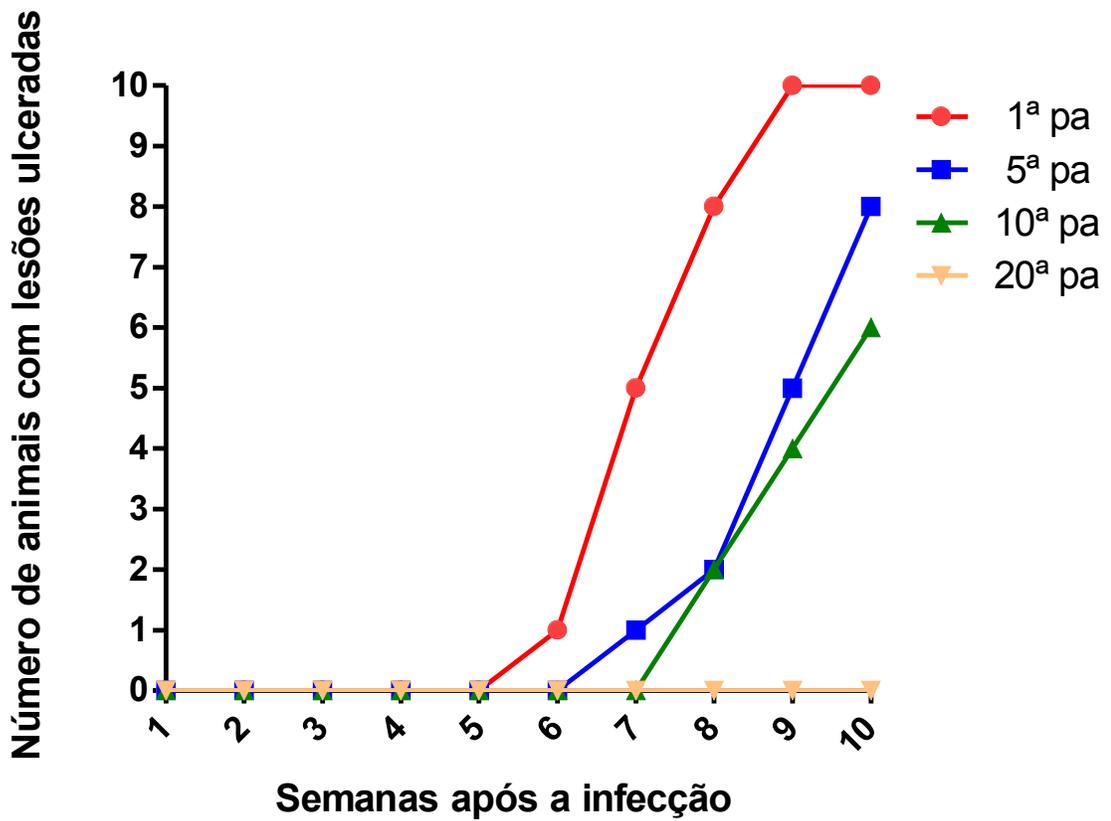


Figura 4.3. Número de camundongos com ulcerações das lesões nos grupos de animais infectados com 1^a, 5^a, 10^a, 20^a passagens, durante um período de 10 semanas. Em cada experimento foram utilizados 10 animais por grupo. Os dados representam a média de dois experimentos realizados de forma independente

4.2.2 Perda da virulência *in vitro*

A avaliação da virulência dos promastigotas de fase estacionária mantidas em diferentes subculturas também foi avaliada através da capacidade de infectar macrófagos de camundongos BALB/c obtidos a partir de lavado peritoneal, utilizando culturas de 1^a, 5^a e 10^a passagens. A infecção foi realizada em uma proporção de 1 promastigota para cada 4 macrófagos e mantida durante 24 horas. Todas as placas de cultura possuíam poços controle contendo somente macrófagos aderidos, sem a adição dos promastigotas, com o objetivo de comparar a morfologia natural das células com e sem infecção.

A carga parasitária nos macrófagos testados diminuiu em função do número das subculturas, o que foi demonstrado através do decréscimo da porcentagem média de macrófagos infectados e pela quantidade média de amastigotas a cada 100 macrófagos infectados (Fig.4.4 e Fig.4.5).

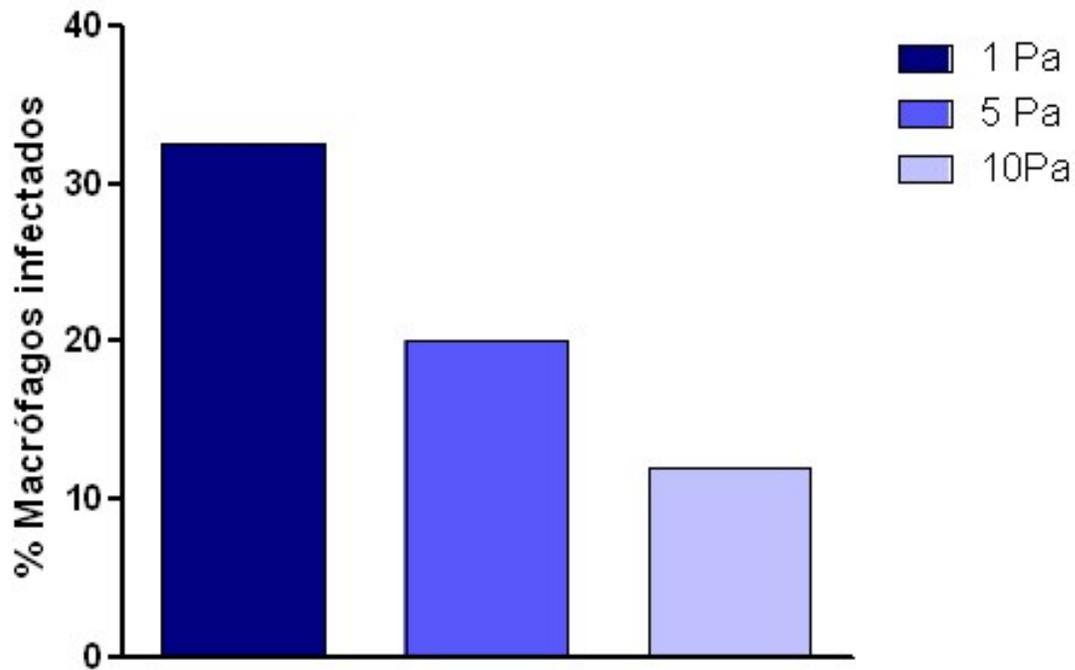


Figura 4.4. Quantificação dos macrófagos infectados com promastigotas de fase estacionária de 1^a (1 PA), 5^a (5 PA) e 10^a (10 PA) passagens, utilizando a proporção de uma promastigota a cada quatro macrófagos, em uma infecção mantida por 24 horas. Os dados representam a média de dois experimentos realizados de forma independente.

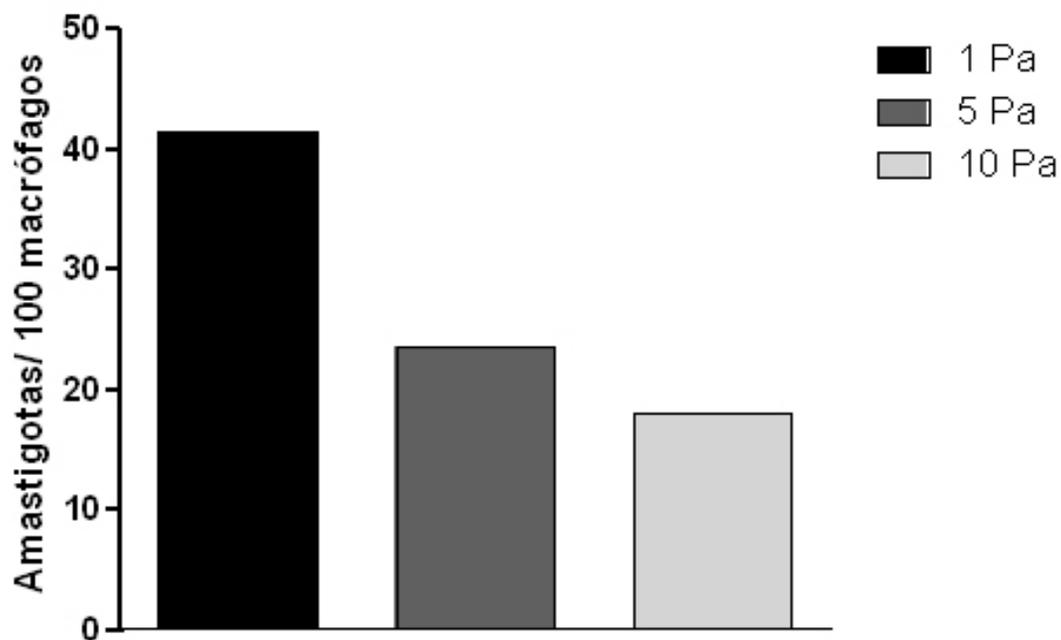


Figura 4.5. Quantificação de amastigotas encontradas em cada 100 macrófagos infectados com promastigotas de fase estacionária de 1^a (1 PA), 5^a (5 PA) e 10^a (10 PA) passagens, na infecção mantida por 24 horas. Os dados representam a média de dois experimentos realizados de forma independente.

4.2.3. Quantificação da carga parasitária

A quantificação da carga parasitária foi realizada na 6ª semana após a infecção, utilizando camundongos BALB-c infectados com promastigotas de fase estacionária na 1ª e 10ª passagens, os quais foram eutanasiados para a realização da técnica de diluição limitante nas patas infectadas e nos linfonodos drenantes. Não foi possível utilizar os resultados obtidos com a quantificação dos parasitos nas patas, pois todas as diluições apresentaram os poços positivos na leitura realizada uma semana após o plaqueamento, o que impossibilitou a análise dos dados. Na quantificação da carga parasitária dos linfonodos foi verificado que a carga parasitária do linfonodo resultante da infecção com os promastigotas de 1ª passagem foi maior (4×10^6 parasitos por linfonodo) do que daquele proveniente da infecção por promastigotas de 10ª passagem (4×10^2 parasitos por linfonodo). Na diluição limitante realizada com promastigotas de cultura, verificou-se 100% de eficiência no plaqueamento.

4.3. Determinação da proporção de promastigotas metacíclicas na fase estacionária

A determinação da proporção de promastigotas de fase estacionária utilizando culturas de 1ª, 10ª e 20ª passagens foi realizada utilizando o teste de lise pelo complemento. Os resultados da Figura 5.6 mostram que os promastigotas de 1ª passagem apresentam 70% de promastigotas metacíclicas, a porcentagem diminui ao longo do tempo de subcultivo, pois os promastigotas de 10ª passagem apresentam 20% de formas metacíclicas e as de 20ª passagem apresentam 1% de formas metacíclicas.

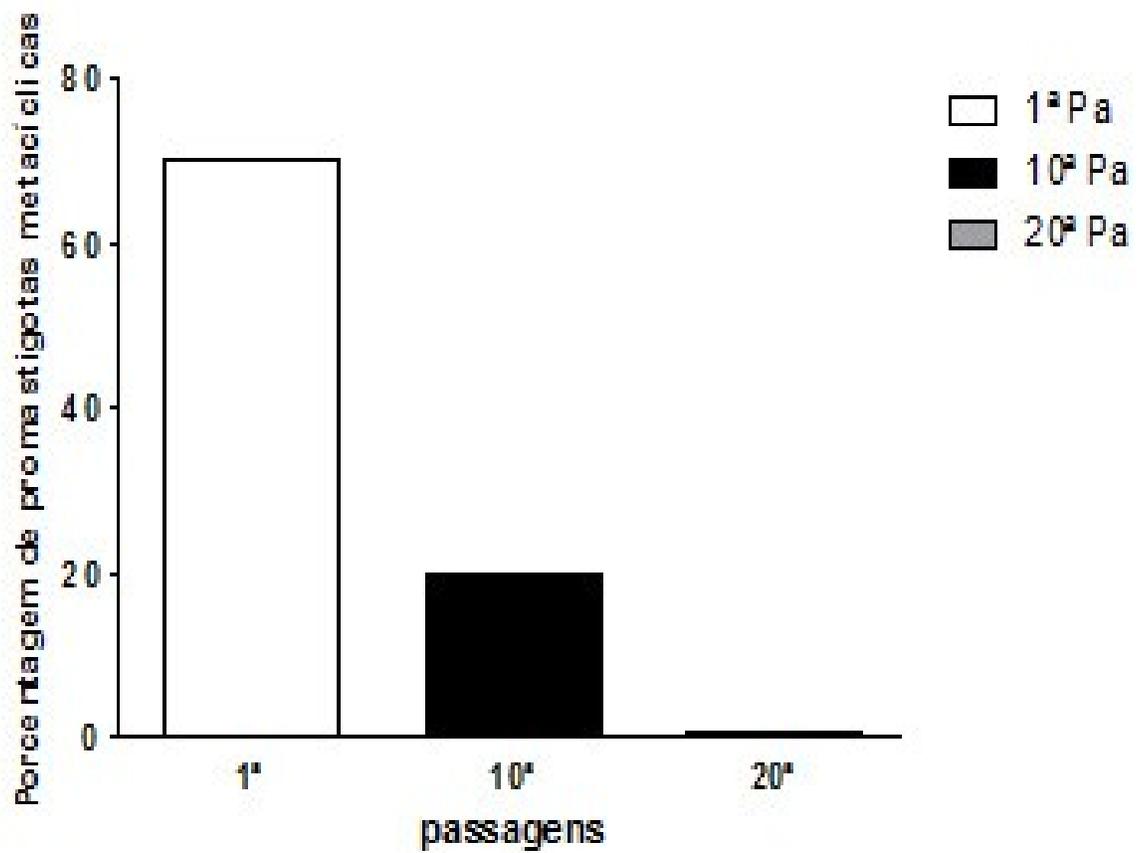


Figura 4.6. Porcentagem de promastigotas metacíclicas nas culturas de promastigotas de fase estacionária de 1ª, 10ª e 20ª passagens obtidas através da técnica de lise pelo complemento.

4.4. Avaliação da expressão da KMP-11 ao longo do cultivo *in vitro*

4.4.1. Avaliação da expressão da proteína KMP-11 ao longo do cultivo *in vitro* por citometria de fluxo

Foi realizada uma avaliação quantitativa da expressão de KMP-11 na superfície das formas promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis* de 1^a, 5^a e 10^a e 20^a passagens ao longo do cultivo *in vitro*. A proteína foi detectada por citometria de fluxo, com o auxílio de um anticorpo monoclonal anti-KMP-11 (Cedarlane, Canadá). Os dados da emissão de fluorescência indicam que houve um decréscimo na expressão da proteína em função do número de subculturas (Figura 4.7), evidenciado pela diminuição dos valores das médias de intensidade de fluorescência (MFI). O MFI é obtido através da medição da intensidade de cada evento, de onde é calculada uma média.

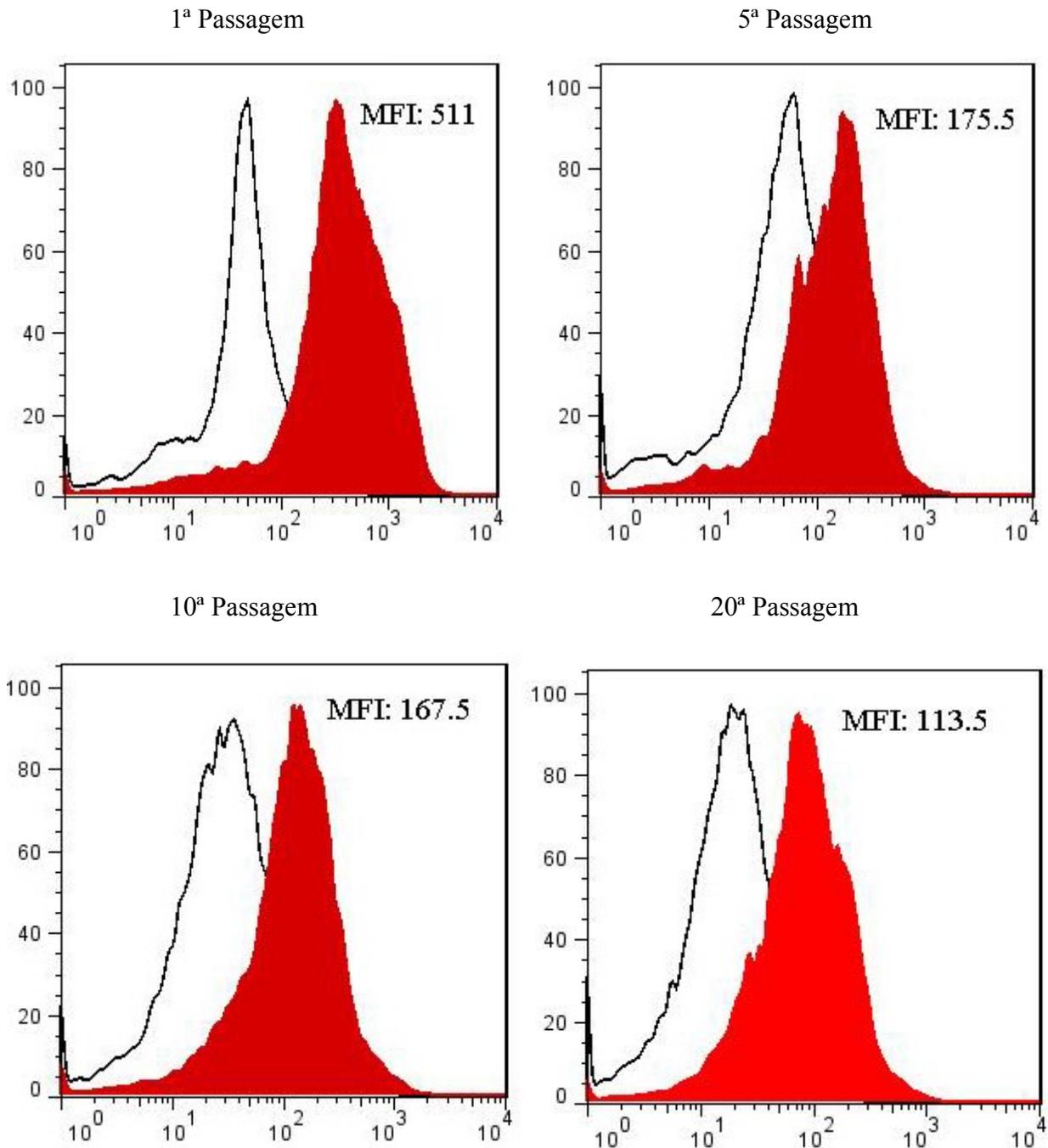


Figura 4.7. Análise por citometria de fluxo da expressão de KMP-11 nos promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis* em diferentes passagens. Os promastigotas foram marcadas com o anticorpo primário anti KMP-11 e o anticorpo secundário conjugado com PE. Os histogramas de cor branca representam os obtidos com o isotipo controle. A leitura foi realizada com uma contagem de 20.000 eventos. As figuras representam as médias de três experimentos independentes. MFI: Médias da intensidade de fluorescência.

4.4.2. Avaliação da expressão do gene de KMP-11 a nível de mRNA ao longo do cultivo *in vitro* pelo método de PCR em tempo real

Para avaliar a expressão do gene de KMP-11 a nível de mRNA, isolamos o RNA total do extrato de promastigotas de *L. amazonensis* de 1^a, 5^a, 10^a, 20^a e 30^a passagens. Para cada amostra de RNA de cada passagem foi realizada uma análise qualitativa através da eletroforese em gel de agarose 1,2% (Figura 4.8), o que demonstrou que o RNA isolado apresentava uma ótima qualidade e não apresentava nenhum sinal de degradação, caracterizado pelos RNAs ribossomais 28S 18S e 5S. O RNA isolado foi quantificado e reversamente transcrito em cDNA, para a posterior amplificação da seqüência da proteína KMP-11 utilizando um “primer” específico (Tabela 3.1).

Os ensaios foram realizados com o reagente SYBER green, dessa forma, foi preciso construir um curva de dissociação para checar a especificidade dos ensaios para o gene de KMP-11 e β tubulina. Os resultados demonstraram um único pico de temperatura de dissociação para os produtos amplificados pelos iniciadores utilizados (T_m “Melting temperature” = 82,28°C para KMP-11 e T_m = 79,49 °C para β tubulina), indicando que os ensaios de PCR em tempo real foram específicos para os genes testados. A curva também mostra que os resultados não representam ampliações inespecíficas, contaminações ou dímeros de iniciadores (Figura 4.9).

Utilizando o gene que codifica beta-tubulina como normalizador da reação, não foi possível encontrar diferença estatisticamente significativa da quantidade de transcritos do gene da proteína KMP-11 entre as passagens analisadas (Fig 4.10).

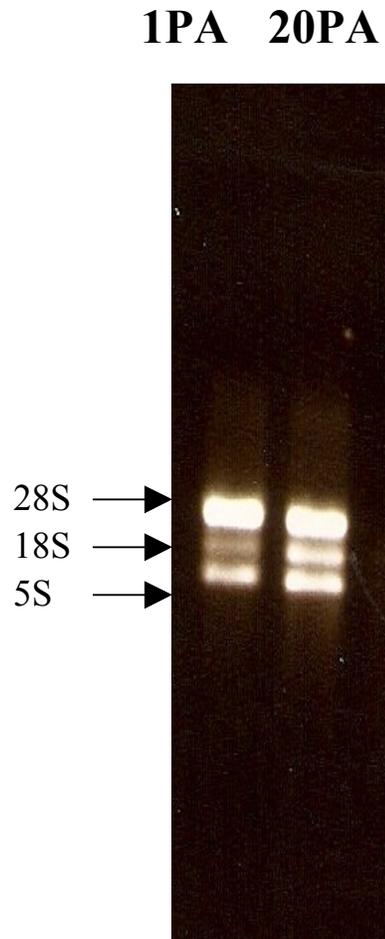


Figura 4.8. Análise qualitativa através da eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) desnaturante do RNA total do extrato de promastigotas de 1^ae 5^a passagens de *L. amazonensis*. As três bandas correspondem, respectivamente, aos RNAs ribossomais 28S, 18S e 5S.

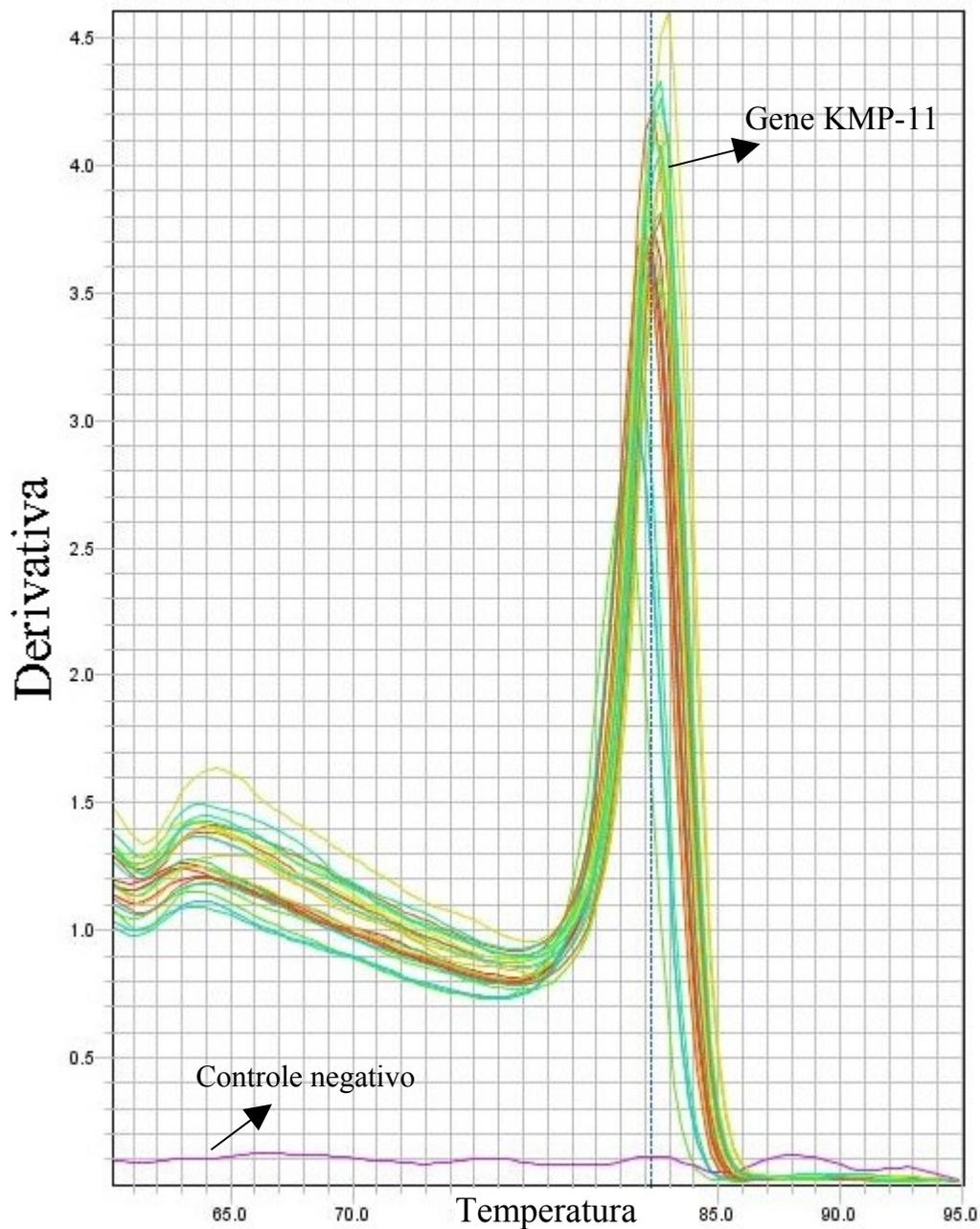


Fig.4.9. Curva de dissociação da PCR em tempo real utilizando SYBER green para o gene de KMP-11 (gene de interesse), obtido a partir da temperatura de desnaturação do produto amplificado. O gráfico expressa a derivativa da curva de dissociação do produto amplificado a partir do iniciador para o gene KMP-11, demonstrando o pico na temperatura de 82,28 °C que comparado ao controle negativo não apresenta pico de dissociação. Esse resultado é representativo de dois experimentos realizados de forma independente.

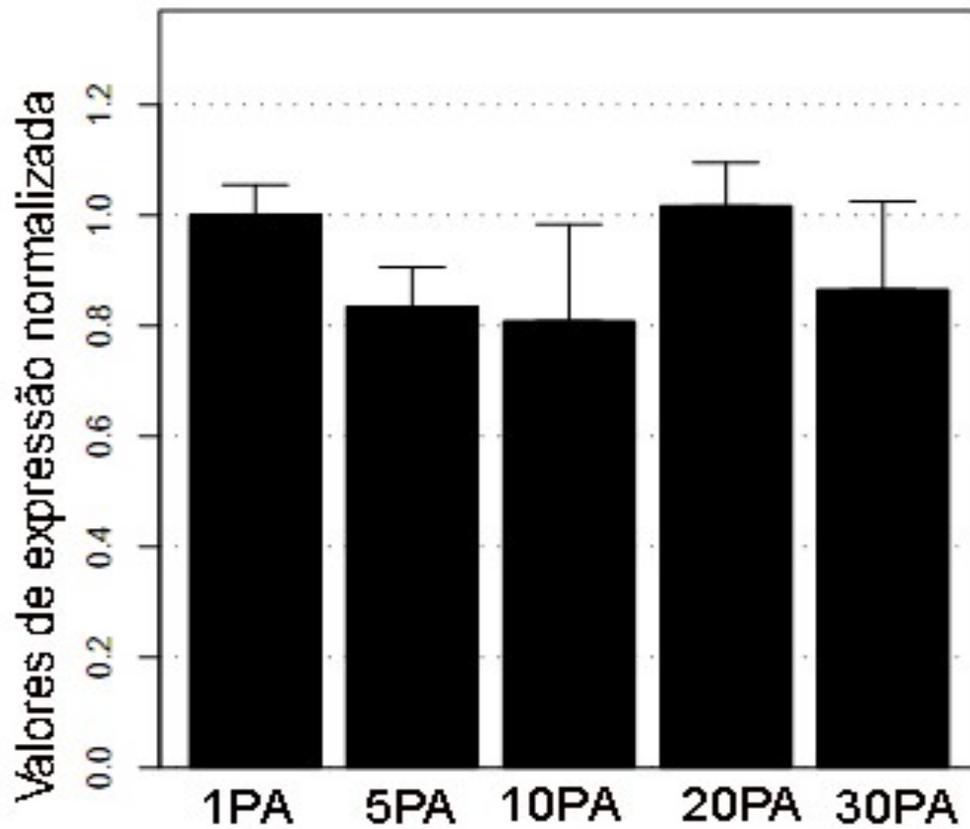


Figura 4.10. Quantificação do gene de KMP-11 de *L. amazonensis* por PCR em tempo real. Os produtos foram amplificados a partir de cDNA obtidos dos promastigotas de fase estacionária de 1^a, 5^a, 10^a, 20^a e 30^a passagens. A reação foi normalizada com o gene da beta tubulina. Os dados representam a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes.

5. Discussão

Neste estudo, foi avaliada a evolução da expressão do gene de KMP-11 de *L. amazonensis* ao nível de RNA e de proteína durante passagens sucessivas de promastigotas de cultivo *in vitro*, investigando se há associação entre a sua expressão e a virulência dos parasitos. O cultivo a longo prazo das formas promastigotas levou a um decréscimo na virulência das mesmas, verificado pelo acompanhamento da infecção *in vivo* de camundongos BALB-c, frequência de ulcerações nas lesões e quantificação da carga parasitária. O decréscimo da virulência dos promastigotas foi observado também na infecção *in vitro* de macrófagos murinos. O acompanhamento da progressão da lesão demonstrou que os camundongos infectados com as passagens iniciais desenvolveram lesões maiores do que aqueles com os promastigotas mantidos em cultura por mais tempo, assim como apresentaram maior frequência de ulcerações em suas lesões. Os resultados das medições de pata foram confirmados pela quantificação da carga parasitária realizados nos linfonodos drenantes das patas infectadas com 1ª e 10ª passagens, que demonstrou que havia uma quantidade 10.000 vezes maior de parasitos no linfonodo na infecção por promastigotas de 1ª passagem quando comparada à encontrada na infecção com parasitos de 10ª passagem. Na infecção *in vitro* de macrófagos, foi observado que as formas promastigotas perdem gradualmente a habilidade de infectar os macrófagos, pois a carga parasitária nos macrófagos testados diminuiu em função do número das subculturas, confirmando a diminuição da virulência dos promastigotas.

A alteração na virulência de promastigotas de *Leishmania* devido ao cultivo a longo prazo foi descrita na literatura por alguns autores, porém as causas da perda da virulência ainda permanecem desconhecidas. Gianini e colaboradores (1974) demonstraram que o cultivo *in vitro* prolongado pode resultar na perda da virulência, porém essa perda é dependente de muitos fatores como: a espécie de *Leishmania*, o meio de cultura e fase de crescimento. A perda da virulência demonstrada através do monitoramento do tamanho de lesões de camundongos, ou seja, infecção *in vivo*, foi realizada também por Segovia et al., (1992) utilizando diferentes linhagens de *L. major*. Naquele estudo, somente os promastigotas mantidos em cultura por tempo prolongado (3 meses em cultura), apresentavam maiores diferenças na infectividade. É interessante observar que no presente estudo, foram observadas diferenças significativas de virulência em culturas mantidas em curto prazo (entre a 1ª e a 5ª passagens). Este contraste entre os resultados dos dois estudos pode ser devido ao fato de terem sido utilizadas espécies diferentes (*L. major* e *L. amazonensis*), com padrões distintos de crescimento em cultura. O autor sugere que as passagens sucessivas *in*

vitro beneficiariam os parasitos menos virulentos, que, segundo ele, se reproduzem mais rápido. A alteração na virulência também foi descrita por da Silva & Sacks em 1987, com *L. major* (infecção *in vivo*), Mukhopadhyay et al., em 1998 com *L. donovani* (infecção *in vitro* de macrófagos), Assis em 2008 com *L. amazonensis* (infecção *in vivo*) e Rebello et al., em 2010 com *L. braziliensis* (infecção *in vitro* de macrófagos).

Os promastigotas metacíclicos são as formas infectivas para o hospedeiro vertebrado. Estas formas são alvos de vários estudos devido ao seu papel no estabelecimento da infecção e da doença. Estas formas são resistentes aos efeitos líticos do sistema complemento. Nossos resultados demonstraram que a proporção de formas metacíclicas de *L. amazonensis* decresce em função do número de subculturas, o que confirma os dados na literatura obtidos por Lei et al., (2010), que demonstraram que a manutenção das formas promastigotas de *L. donovani* em culturas seriadas resulta na perda progressiva de resistência ao complemento, ou seja, resulta em uma proporção menor de formas metacíclicas. Cysne-Finkelstein e colaboradores (1998) também demonstraram essa diminuição da proporção de metacíclicas para *L. amazonensis* da cepa MHOM/77/LTB0016, pois na primeira passagem havia 73% de metacíclicas e em promastigotas mantidas por mais de 30 passagens *in vitro* não foi detectada nenhuma forma metacíclica. Resultados semelhantes foram obtidos por Silva & Sacks (1987) utilizando cepas de *L. major*. Estes autores sugerem que a atenuação da virulência das formas promastigotas pode ser atribuída ao drástico declínio na metaciclogênese enquanto os promastigotas são mantidos em cultura por longos períodos. O processo pelo qual as passagens seriadas interferem na metaciclogênese pode envolver moléculas que controlam o desenvolvimento biológico normal do parasito (Lei et al., 2010).

Alterações bioquímicas ou genéticas ocorrem nos promastigotas enquanto estão sendo mantidos em culturas sucessivas, a adaptação *in vitro* é relacionada a algumas modificações que ocorrem nos antígenos de superfície, transcritos e até nos cromossomos. (Handman et al., 1983; Segovia et al., 1992). Durante a manutenção do cultivo *in vitro*, há a diminuição da expressão de algumas moléculas presentes no parasito, essas moléculas estão possivelmente associadas com os mecanismos de infecção e virulência do parasito (Segovia et al., 1992).

A proteína KMP-11 é uma proteína presente em todos os cinetoplastideos, com alto nível de conservação (95%) entre os parasitos do gênero *Leishmania* (Ramirez et al., 1998). Na espécie *L. amazonensis*, essa proteína está presente nas formas amastigotas e promastigotas e sua expressão é maior nos amastigotas do que nos promastigotas. Além disso, a KMP-11 é regulada positivamente durante a metaciclogênese (Matos et al., 2010). Essa proteína também foi capaz de

estimular fortemente a produção de IL-10 em células humanas, uma citocina importante na regulação da reação inflamatória crônica, que age diretamente na desativação de macrófagos e manutenção da persistência parasitária (de Carvalho et al., 2003; Belkaid et al., 2002). Sua expressão aumentada nas formas amastigotas e promastigotas metacíclicas e a produção de IL-10 estimulada pela proteína, indicam que a KMP-11 possui uma função na sobrevivência do parasito no hospedeiro mamífero, podendo estar associada à sua virulência.

A membrana plasmática dos parasitos possui uma importante função no processo de infecção. As proteínas ou glicoproteínas de membrana desempenham funções estruturais que estão envolvidas em diferentes processos como adsorção, transporte de nutrientes, reconhecimento celular e escape (Soares et al., 2003; de Souza W, 1995). A citometria de fluxo tem sido utilizada para a quantificação de proteínas de superfície de células de mamíferos (Cole et al., 1999), podendo ser utilizada também para células de parasitos (Cuervo et al., 2008). Nós empregamos essa metodologia para realizar a quantificação da proteína KMP-11 na membrana das formas promastigotas de fase estacionárias de 1^a, 5^a, 10^a e 20^a passagens. Nossos resultados mostraram que a expressão dessa proteína diminui em função do número de subculturas. Dessa forma, podemos afirmar que o decréscimo na expressão de KMP-11 é proporcional ao número de subculturas, pois os parasitos mantidos em cultura por um menor número de passagens são mais virulentos e expressam maior quantidade da proteína.

Foi realizado teste de correlação linear para se verificar se além da associação, poderia haver também uma provável relação de causa e efeito entre a expressão de KMP-11 e a virulência. Foi encontrado um valor de $p=0,06$ quando este teste foi realizado entre a expressão da proteína KMP-11 nas superfícies dos promastigotas de fase estacionária das diferentes passagens e o diâmetro das patas infectadas com as mesmas. Como o número de pontos analisado era muito baixo, é possível que utilizando-se um número maior de pontos se obtivesse um resultado significativo ($p<0,05$) neste teste.

A utilização de parasitos mantidos em diversas passagens *in vitro* tem sido usada por vários autores para avaliar a expressão de moléculas que são consideradas como fatores de virulência, de forma a verificar se a expressão dessas moléculas diminui nos parasitos considerados menos virulentos. Lima e colaboradores (2009) demonstraram que os promastigotas de *L. braziliensis* mantidos em cultura (avirulentos) apresentaram um acentuado decréscimo na produção de peptidases e essas proteínas têm sido descritas em muitos tripanosomatídeos como moléculas importantes no processo de virulência. As cepas virulentas e avirulentas mostraram diferenças tanto qualitativas como quantitativas na atividade proteolítica. Rebello e colaboradores

(2010) propuseram que as CPs de *L.braziliensis* possam ter a expressão modulada, assim como a atividade enzimática, durante as passagens *in vitro* de promastigotas de fase estacionária.

Resultados semelhantes foram obtidos para a metaloproteinase GP63, pois houve decréscimo da expressão dessa enzima nas formas promastigotas avirulentas quando comparadas às cepas virulentas, tanto para *L.chagasi* (Brittingham et al., 2001; Lei et al., 2010) como para *L.major* (Sádlova et al., 2006). Entretanto, o mesmo resultado não foi obtido para outras espécies como *L. amazonensis* (Soares et al., 2003) e *L. braziliensis* (Cuervo et al., 2008), pois não houve diferença na expressão de GP63 entre as cepas virulentas e avirulentas. Isso demonstra que há diferenças espécie-específicas na função dessa proteína dentro do gênero *Leishmania*.

Soares e colaboradores (2003) demonstraram que promastigotas virulentas de *L. amazonensis* da cepa MHOM/BR/75 Josefa, apresentaram um padrão de proteínas mais complexo, rico em peptídeos ácidos, em comparação com as formas avirulentas. Os autores supõem que, em *L. amazonensis*, há uma família de proteínas que são expressas em maior quantidade nas formas virulentas e que estas proteínas seriam diferencialmente processadas.

Nós verificamos a diminuição da expressão da KMP-11 nas formas promastigotas de *L. amazonensis*, porém não se sabe se isto se aplica a outras espécies de *Leishmania*. Entretanto, Mukhopadhyay e colaboradores (1998) demonstraram a diminuição da expressão de KMP-11 em promastigotas de *L. donovani*, avaliando somente a nível de RNA, assim como a diminuição conjunta da expressão do LPG. O autor argumenta que, devido aos parasitos não encontrarem condições severas no ambiente extracelular, eles gradualmente reduzem a síntese de moléculas necessárias para a sobrevivência intracelular.

A técnica de PCR em tempo real quantitativa representa uma metodologia bastante sensível, com alta reprodutibilidade e rendimento na quantificação de transcritos de mRNA de uma dada amostra (Small et al., 2008). Na avaliação da expressão da KMP-11 a nível de mRNA pela técnica de PCR em tempo real, foi verificado no presente estudo uma ausência de diferença estatisticamente significativa na quantidade de transcritos de KMP-11 em promastigotas mantidas por diferentes números de passagens sucessivas de cultivo *in vitro*. É interessante observar que, ao contrário do observado por Mukhopadhyay et al., 1998 nossos resultados não encontraram uma diminuição na expressão de KMP-11 a nível de RNA ao longo das subculturas, entretanto o autor encontrou esses resultados através da técnica de Northern Blot, uma técnica que não possui uma abordagem quantitativa como o PCR em tempo real, além de utilizar uma espécie diferente (*L. donovani*).

Em tripanossomatídeos, os genes codificadores são organizados em *tandem* separados por regiões intergênicas curtas. Esses genes são transcritos em precursores de RNA policitrônico que são processados em mRNAs monocitrônicos maduros (Brittingham et al., 2001). Os genes que estão próximos um ao outro, e possuem uma orientação comum são cotranscritos. Os mRNAs individuais são clivados de seu precursor através de uma reação de “trans-splicing”, na qual é adicionada uma capa de RNA de aproximadamente 40 nucleotídeos, chamada de “splice-leader”, na região 5’ e ocorre uma poliadenilação na região 3’ (Clayton C, 2002).

Muitas proteínas de tripanossomatídeos são diferencialmente expressas durante o ciclo biológico, pois eles precisam se adaptar a dois ambientes, com diferentes temperaturas, nutrientes e mecanismos de defesa. A transcrição desses genes codificadores é realizada pela RNA polimerase II de forma policitrônica e constitutiva. Esses organismos possuem uma característica única, representada pela escassez de promotores da RNA Pol II (Clayton, 2002; Horn, 2008). O controle transcricional é extremamente limitado em comparação a outros organismos, conseqüentemente, a regulação do controle diferencial da expressão de proteínas da maioria dos genes ocorre de forma pós-transcricional. Dessa forma, a estabilidade do RNA, taxa de tradução e modificações pós-traducionais contribuem para a modulação da expressão gênica (Duncan R, 2004; Rosenzweig et al., 2008).

Os transcritos possuem uma região 3’ não traduzida (UTR) que pode estar envolvida na diferenciação de um estágio para outro, através de alterações na estabilidade e tradução do RNA. Algumas sequências conservadas têm sido encontradas na região 3’ não traduzida de um grande número de transcritos de *Leishmania*. Estas sequências parecem ser responsáveis pelo controle traducional estágio-específico (McNicoll et al., 2006)

A mudança na quantidade de transcritos durante o ciclo biológico em *Leishmania* não é tão nítida como nos organismos que regulam a expressão gênica no início da transcrição, a porcentagem de genes na qual a abundância de mRNA varia durante o ciclo é de aproximadamente 1-3,5%, uma taxa muito menor do que aquela relacionada às proteínas (10%). O contraste existente entre a expressão aumentada de mRNA e a presença em menor quantidade ou ausência do produto gênico é devida outros mecanismos, como a regulação traducional e pós traducional (McNicoll et al., 2006).

A falta da associação entre a quantidade de RNA e o produto gênico (proteína) já foi encontrada por alguns autores no estudo do parasito *Leishmania*. Rebello e colaboradores (2010) avaliaram a quantidade de transcritos do gene de cisteína proteinase de promastigotas de *L. braziliensis* e demonstraram que há um aumento na proporção dos transcritos à medida que os

promastigotas são mantidos em cultura, contrariando a expressão a nível de proteína e atividade enzimática, que diminuíram em função do tempo. Entretanto, há no mínimo três cópias gênicas de CPs em *L. braziliensis*, de forma que a cópia utilizada para o desenho do primer pode ter sido alternativamente expressa durante o cultivo *in vitro* (Rebello et al., 2010). No estudo feito por McNicoll et al., (2006), foi realizada uma correlação entre a expressão de uma série de proteínas de *Leishmania* e o mRNA, os autores encontraram um baixo nível de correlação entre as proteínas que são reguladas de acordo com o estágio do parasito e a expressão do mRNA, derivados do mesmo gene. Além disso, os níveis de RNA da maioria dos genes codificadores de proteínas presentes em ambos os estágios do parasito, eram semelhantes.

As modificações pós-traducionais como fosforilação, metilação, acetilação e glicosilação podem regular a função da proteína, a estabilidade e o seu nível de produção/degradação (Rosenzweig et al., 2008). Em *L. donovani*, a proteína KMP-11 sofre modificação pós-traducional envolvendo a metilação da arginina na posição 45 (Jardim et al., 1995a). Embora, o papel exato dessa modificação ainda não esteja claro, os autores inferiram que o aumento na porção hidrofóbica poderia ser um possível benefício para o parasito, permitindo que a arginina torne-se mais estável termodinamicamente em um ambiente não-polar. Além disso, esse resíduo de arginina modificado é conhecido como um inibidor competitivo da óxido nítrico sintase, a monometilarginina iria contribuir para inibição da enzima e sobrevivência do parasito dentro do fagolisossomo (Ramírez et al., 1998; Jardim et al., 1995a). No entanto, este fenômeno, se verdadeiro, seria restrito a *L. donovani*, porque nas sequências de KMP-11 em outras espécies a posição 45 é ocupada por lisina (Sanchez-Arcila JC, 2010).

A ausência de associação entre a expressão proteica de KMP-11 e a quantidade de mRNA também foi encontrada por Fadili et al., (2010), pois os amastigotas de *L. infantum* resistentes ao antimonial, apresentavam um decréscimo na expressão da proteína KMP-11, o que não era encontrado a nível de mRNA. O autor sugere que possam ocorrer alterações nas modificações pós-traducionais da KMP-11 nas linhagens que são resistentes à droga, acelerando a degradação da proteína.

O gene da beta tubulina é um dos controles normalizadores mais utilizados nos ensaios de PCR em tempo real devido as suas funções essenciais na estrutura do citoesqueleto (Thellin et al., 1999), dados da literatura mostram que esse gene foi utilizado também como controle endógeno normalizador na quantificação de mRNA do gene da KMP-11 em *L. donovani* (Mukhopadhyay et al., 1998). Entretanto, como a PCR em tempo real realizado no presente estudo não indicou aumento da quantidade de transcritos do gene da proteína KMP-11, este resultado poderia ser

atribuído ao uso de um normalizador inadequado. A exigência básica para que um gene seja utilizado como normalizador é a expressão constitutiva entre os grupos estudados. Todavia, dados relacionados a algumas espécies sugerem que os genes de referência mais comumente utilizados como normalizadores (actinas, tubulinas e GAPDH) podem variar dependendo do estágio de desenvolvimento ou estado fisiológico da espécie estudada (Thellin et al., 1999; Ohl et al., 2006; Small et al., 2008). Ouakad e colaboradores (2007) realizaram uma comparação entre diferentes normalizadores utilizados nas análises de PCR em tempo real com diferentes formas evolutivas de *L. major*. Os autores encontraram somente um gene normalizador adequado em comparação a um grupo de outros genes considerados como candidatos em potencial, pois este gene (rRNA45) apresentou níveis de expressão estáveis entre os vários estágios de desenvolvimento de *L. major*. Além disso, é recomendado que a normalização seja baseada em mais de um gene de referência, para que o resultados sejam mais precisos (Ohl et al., 2006).

A função da proteína KMP-11 na biologia do parasito *Leishmania* ainda não foi caracterizada, porém a expressão dessa proteína foi relacionada à virulência de *L. donovani* (Mukhopadhyay et al., 1998). Nossos resultados utilizando promastigotas mantidas em cultura de *L. amazonensis* contribuem para a caracterização da KMP-11 como um fator de virulência, pois a perda da virulência associada com a diminuição da expressão de KMP-11 indica que esta molécula possui uma função na infectividade das formas promastigotas de *Leishmania*, podendo estar relacionada com a virulência do parasito. O significado funcional dessa associação ainda não está caracterizado. Além disso, esta proteína possui outras características que condizem com esta hipótese, como o fato da KMP-11 estimular a produção de IL-10 em células humanas, tanto de pacientes com leishmaniose tegumentar americana, controles sadios e indivíduos portadores de infecção assintomática por *L. chagasi* (de Carvalho et al., 2003), já que a IL-10 é a principal citocina reguladora da resposta inflamatória crônica, além de inibir os mecanismos responsáveis pela destruição dos amastigotas intracelulares (de Carvalho et al., 2003; Padigel et al., 2003). Em doenças como a leishmaniose, a alta produção de IL-10 é benéfica para o parasito, devido à sua habilidade de desativar a resposta do tipo 1, permitindo a multiplicação dos parasitos (Bazzoni et al., 2009). Adicionalmente, a KMP-11 é expressa tanto nas formas amastigotas como nas formas promastigotas e sua expressão é maior nas formas metacíclicas, formas infectivas, e nos amastigotas que são o estágio evolutivo presente nos hospedeiros mamíferos (Matos et al., 2010). Estas características indicam que esta molécula possa ter uma função na sobrevivência do parasito no hospedeiro mamífero. Além disso, resultados recentes do nosso grupo demonstraram que a KMP-11 é capaz de aumentar significativamente a carga parasitária durante a infecção *in*

vitro de macrófagos por *L. amazonensis* através da indução da produção autócrina de IL-10, juntamente com uma diminuição da produção de NO e aumento da atividade de arginase (Lacerda DI et al., submetido). Todas estas observações, consideradas em conjunto, sugerem que KMP-11 é um fator de virulência para *L. amazonensis*.

A identificação e caracterização de fatores de virulência é importante no estudo das leishmanioses, pois essas doenças constituem um grupo de enfermidades com variadas expressões clínicas (Chang & Mgwire, 2002). Embora a virulência de *Leishmania* possa ser modulada por fatores ambientais e genéticos relacionados aos hospedeiros mamíferos e vetores, algumas moléculas do parasito são elementos-chave no estabelecimento e no desenvolvimento da infecção, ou seja, são determinantes na virulência (Rivas et al., 2004).

Os macrófagos são as células que servem como hospedeiros para o desenvolvimento intracelular do parasito, estas células desempenham também o principal papel efetor no controle da infecção e eliminação do parasito. A maioria das espécies de *Leishmania* possui estratégias para subverter as respostas imunes inata e adaptativa (Gómez & Olivier, 2010). Alguns fatores de virulência estão diretamente relacionados com os mecanismos de evasão do parasito e persistência da infecção. A identificação das moléculas que atuam nos processos específicos de evasão do sistema imune pode ajudar a impedir ou diminuir a multiplicação do parasito ou a entrada no macrófago.

Os fatores de virulência evoluíram através dos anos, inseridos em um equilíbrio entre o parasito e sistema imune do hospedeiro, de forma a aumentar a sobrevivência dos parasitos e conferir um nível de dano ao hospedeiro suficientemente moderado a ponto de possibilitar a transmissão do agente infeccioso antes da morte do hospedeiro. A identificação das funções dos fatores de virulência tem auxiliado a desvendar os mecanismos que são utilizados pelos parasitos para sobreviver sob as mais diversas condições natural e artificialmente estressantes, assim como revelar os elementos do hospedeiro que interagem ou são modificados pelos fatores de virulência do parasito (Rivas et al., 2004).

Uma complexidade adicional nos estudos de virulência é integrar a descrição das características fenotípicas em uma rede mais complexa onde a expressão gênica é regulada, onde essas características podem ou não ser expressas durante o ciclo biológico do parasito (Rivas et al., 2004).

Na ausência de uma vacina eficaz e com os problemas relacionados às alternativas quimioterápicas disponíveis atualmente, tais como resistência, alto custo do tratamento, efeitos colaterais, longa duração causando baixa adesão ao tratamento (Gómez & Olivier, 2010), a

identificação de novos fatores de virulência e a caracterização de seu papel biológico tem grande potencial de contribuir para o desenvolvimento de vacinas e terapias eficazes.

6. Conclusões

- As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* perdem a virulência *in vivo* de acordo com o aumento no número de passagens. Isto foi verificado através do acompanhamento da evolução da doença (medição das lesões cutâneas) e pela quantificação da carga parasitária nos linfonodos drenantes das patas infectadas. Houve uma diminuição no diâmetro das lesões, na frequência de surgimento de ulcerações e da carga parasitária nos linfonodos analisados, associada ao aumento do número de passagens de cultura.
- Na infecção *in vitro*, a carga parasitária nos macrófagos testados diminuiu em função do número das subculturas, o que foi demonstrado pela porcentagem de macrófagos infectados e número de amastigotas por macrófago infectado.
- A perda da virulência também foi associada à diminuição da proporção de promastigotas metacíclicas ao longo das subculturas, verificada pela técnica de lise pelo complemento.
- Houve um decréscimo na expressão de KMP-11 em função do número de subculturas evidenciado através da citometria de fluxo pela diminuição dos valores das médias de intensidade de fluorescência (MFI).
- Não houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de transcritos do gene da proteína KMP-11 entre as culturas com diferentes números de passagens, analisada através da técnica de PCR em tempo real.
- Os resultados utilizando promastigotas mantidas em cultura de *L. amazonensis* contribuem para a caracterização da KMP-11 como um fator de virulência, pois a perda da virulência associada com a diminuição da expressão da proteína KMP-11 sugere que esta molécula possua uma função na infectividade das formas promastigotas de *Leishmania*, embora essa função ainda não esteja caracterizada.

7. Perspectivas

Continuar a caracterização do papel de KMP-11 como fator de virulência em *L. amazonensis*, através das seguintes abordagens adicionais.

- Avaliar o efeito de KMP-11 na infecção *in vitro* de macrófagos por *L. amazonensis*
- Comparar os perfis de citocinas presentes em culturas de macrófagos infectados com culturas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) com diferentes números de passagens.
- Comparar a expressão de KMP-11 em diferentes cepas de *L. amazonensis* com diferentes graus de virulência.
- Verificar o efeito da adição de KMP-11 na infecção *in vivo*.
- Tentar desenvolver mutantes deficientes em KMP-11 e avaliar sua virulência.

8. Referências Bibliográficas

Aga E, Katschinski DM, Zandbergen GV, Laufs H, Hansen B, Müller K, et al. Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular *Leishmania major*. Parasite. J Immunol. 2002; 169; 898-905.

Alencar, JE. Leishmaniose visceral no Brasil. Revista de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 1977; v. 17/18, p. 129-148.

Alexander J, Satoskar AR, Russel DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. J. of Cell Science. 1999; 112, 2993-3002.

Alrajhi AA. Cutaneous leishmaniasis of the Old World. Skin Therapy Lett. 2003; 8(2):1-4.

Altamirano- Enciso, A. J, Marzochi MCA, Moreira JS, Schubach AO, Marzochi KBF. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. História, Ciências, Saúde. 2007 ; 03 vol. 10(2): 853-82.

Alves CR, Figueiredo LJO, Saraiva FALO, De Simone SG. Molecular modeling study on a *Leishmania* cysteine proteinase. J. Mol. Struct. 2001; 539, 289–295.

Antoine JC, Prina E, Lang T, Courret N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. Trends microbiol. 1998; Vol 07, N°20.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int. J. Parasitol. 2000; 30,1269-1281.

Azeredo-Coutinho RBG. Caracterização da resposta imune de células humanas às proteínas recombinantes LACK E KMP-11 de *Leishmania amazonensis*. 2008.

Azeredo-Coutinho RGB, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella RP, Madeira MF, Pacheco RS, Valete-Rosalino CM, Mendonça SCF. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2007; 101,735–737.

Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun.* 2002; 70(12):6734-40.

Balestieri FMP, Queiroz ARP, Scavone C, Costa VMA, Barral-Netto M, Abrahamsohn IA. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect;* 2002, 23–29.

Barral A, Costa JML, Bittencourt AL, Barral-Neto M, Carvalho EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int J Dermatol.* 1995; 34: 474–479.

Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi G Jr, et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Ame J Trop Med Hyg.* 1991; 44: 536–546.

Basano SA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev. Bras. Epidemiol.* 2004; Vol. 7, Nº 3.

Basso D, Pesarin F, Salmaso L, Solari A. Nonparametric One-Way ANOVA. In: P. Bickel et al, Editors, *Permutation Tests for Stochastic Ordering and ANOVA: Theory and Applications with R*, Springer, New York. 2009; pp. 133–172.

Basu R, Bhaumik S, Basu JM, Naskar K, De T, Roy S. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* 2005; 174(11):7160-7171.

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 2007; 37(10-3): 1097–1106.

Bazzoni F, Tamassia N, Rossato M, Cassatela MA. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10 mediated anti-inflammatory response: lessons from neutrophils. *European Journal of Immunology*. 2010; Volume 40, Issue 9, pages 2360–2368.

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD41CD251 regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. 2002; *Nature*-Vol 420.

Berberich C, Requena JM, Alonso C. Cloning of Genes and Expression and Antigenicity Analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 Protein. *Exp. Parasitol.* 1997; 85, 105–108.

Berlin C. Leishmaniasis recidiva cutis. *Arch Dermatol Syph.* 1940; 41: 874.

Bhaumik S, Basu R, Sem S, Naskar K, Roy S. KMP-11 DNA immunization significantly protects against *L. donovani* infection but requires exogenous IL-12 as an adjuvant for comparable protection against *L. major*. *Vaccine*. 2009;27(9):1306-1316.

Bogdan C, Donhauser N, Döring R, Röllinghoff M, Diefenbach A, and Rittig MG. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med*. 2000; 191: 2121–2129.

Bogdan C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. *Cellular Microbiol.* 2008; 10(6), 1221–1234.

Brittingham A, Miller MA, Donelson JE, Wilson ME. Regulation of GP63 mRNA stability in promastigotes of virulent and attenuated *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2001; 112, 51–59.

Camargo LMA & Barcinski MA. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. *Ciência e cultura*. 2003; 1, 34-37.

Cardoso FO, Souza CSF, Mendes VGA, Abreu-Silva AL, Calabrese KS. Immunopathological Studies of *Leishmania amazonensis* Infection in Resistant and in Susceptible Mice. *The J. Infect. Dis.* 2010; 201(12):1933–1940.

Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 2000; 56: 315-25.

Casadevall A & Pirofski LA. Host-Pathogen Interactions: Redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun.* 1999; p. 3703–3713.

Chang KP & McGwire BS. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2002; 1:1.

Chang KP, Akman L, Nielsen JS. *Leishmania* virulence and genetic heterogeneity. *Clinics Dermatol.* 1999;17:269–273.

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

Clayton CE. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *The EMBO Journal.* 2002; Vol. 21 No. 8 pp.

Coelho ZCB, Teixeira MJ, Mota EF, Sindeaux M, da Silva F, Santana J, et al. *In vitro* initial immune response against *Leishmania amazonensis* infection is characterized by an increased production of IL-10 and IL-13. *Braz J Infect Dis.* 2010; 14(5):476-482.

Cole SW, Jamieson BD, Zack JA. cAMP up-regulates cell surface expression of lymphocyte CXCR4: implications for chemotaxis and HIV-1 infection. *J Immunol.* 1999; 162: 1392-1400.

Costa JML. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. *Gazeta Médica da Bahia* 2005; 75(1):3-17.

Costa LMC. Leishmaniose Tegumentar Americana: Uso de Técnicas da Biologia Molecular (PCR) no Diagnóstico de Infecção em Roedores de Coleção do Museu Nacional – UFRJ. 1998.

Cuervo P, Santos AL, Alves CR, Menezes GC, Silva BA, Britto C, et al. Cellular localization and expression of gp63 homologous metalloproteases in *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. *Acta Trop.* 2008; 106: 143-148.

Cysne-Finkelstein L, Temporal RM, Alves FA, Leon LL. *Leishmania amazonensis*: Long-Term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Experimental Parasitology*.1998; 89, 58–62.

Dantas-Torres F. Epidemiologia da leishmaniose visceral no município de Paulista, Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. 2006.

David CV& Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Therapy*. 2009; Vol. 22, 2009, 491–502.

de Carvalho LP, Soto M, Jeronimo S, Dondji B, Bacellar O, Luz V, et al. Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. *Microbes Infect*. 2003; 5(1):7-12.

De Souza W. Structural organization of the cell surface of pathogenic protozoa. *Micron*. 1995; 26, 405–430.

Delgado G, Parra-López CA, Vargas LE, Hoya R, Estupiñán M, Guzmán F, et al. Characterizing cellular immune response to kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) during *Leishmania (Viannia) panamensis* infection using dendritic cells (DCs) as antigen presenting cells (APCs). *Parasite Immunol*. 2003; 25(4):199-209.

Descoteaux A & Turco SJ. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1455(2-3): 341-52.

Desjardins M & Descoteaux A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Méd*. 1997; 185: 2061-8.

Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol*. 1996;14(5):417-23.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004; 27: 305-18.

Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the RSTMH.* 2001; 95,239-243.

Desjeux P. Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol.* 2001;190(1-2):77-9

Donovan C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Jn Brasil Med.* 1903; 2: 79.

Dourado MICE, Noronha CV, Alcântara N, Ichihara MY, Loureiro S. Epidemiologia da Leishmaniose tegumentar americana e suas relações com a lavoura e o garimpo, em localidade do Estado da Bahia (Brasil). *Revista de Saúde Pública, São Paulo.* 1998; 23:2-8.

Duncan R. DNA microarray analysis of protozoan parasite gene expression: outcomes correlate with mechanisms of regulation. *Trends Parasitol.* 2004; Volume 20, Issue 5, 211-215.

Fadili EK, Drummelsmith J, Roy G, Jardim A, Ouellette M. Down regulation of KMP-11 in *Leishmania infantum* axenic antimony resistant amastigotes as revealed by a proteomic screen. *Exp. Parasitol.* 2009; 123(1):51-57.

Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi Filho G, Sessa PA, Carias A, Jesus A, Alencar JT 1986. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986; 81:155-63.

Falqueto A, Sessa PA, Varejão JBM, Barros GC, Momen H, Grimaldi Jr G. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo State, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991; 86: 499-500.

Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J, Schriefer A, Machado PRL, Lessa H et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and

cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infection and Immunity*. 2005; p. 7853–7859, V. 73.

Furtado VT & Vale ECS. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. *An Bras Dermatol*. 2005; 80 :421-8.

Giannini MS. Effects of promastigote growth phase, frequency of subculture, and host age on promastigote-initiated infections with *Leishmania donovani* in the golden hamster. *LJ Protozool*. 1974;21(4):521-7.

Gómez MA & Olivier M. Proteases and phosphatases during *Leishmania*-macrophage interaction. *Virulence*. 2010; 1:4, 314-318.

Gontijo B & Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2003; 36(1):71-80.

Gramiccia M & Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol*. 2005; 35 (2005) 1169–1180.

Grevelink SA, Lerner EA. Leishmaniasis. *J. Am. Acad. Dermatol*. 1996; 34: 257.

Grimaldi GJ & Tesh R. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. *Clin Microbiol Rev*. 1993, p. 230-250.

Hall BF & Joiner A. Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defences. *Immunol Today*. 1991; 12: A22-A27.

Handman E, Hocking RE, Mitchell GF, Spithill TW. Isolation and characterization of infective and non-infective clones of *Leishmania tropica*. *Mol Biochem Parasitol*. 1983; 7(2):111-26.

Horn D. Codon usage suggests that translational selection has a major impact on protein expression in trypanosomatids. *BMC Genomics*. 2008; 9:2.

Ilg T. Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania Mexicana*. The EMBO Journal. 2000; Vol.19 N°09 pp 1953-1962.

Ilg T. Lipophosphoglycan of the protozoan parasite *Leishmania*: stage-and species-specific importance for colonization of the sandfly vector, transmission and virulence to mammals. Med Microbiol Immunol. 2001; 190:13 -17.

Jardim A, Funk V, Caprioli RM, Olafson RW. Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. Biochem. J. 1995a; 305 :307-313.

Jardim A, Hanson S, Ullman B, McCubbin WD, Kay CM, Olafson RW. Cloning and structure-function analysis of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. Biochem. J. 1995b; 305:315-320.

Jardim A, Tolson D, Turco S, Pearson T, Olafson R. The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan reactive component is a tightly associated protein complex. J Immunol. 1991; 147: 3538-44.

Ji J, Masterson J, Sun J, Soong L. CD4⁺ CD25⁺. Regulatory T Cells Restrain Pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. J Immunol. 2005;174;7147-7153.

Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? Trends Parasitol. 2006 Sep; 22(9):439-45.

Lainson R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1988; 321(1207):389-404.

Lainson, R & Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of the South American leishmaniasis. Biology of the Kinetoplastida. 1979; p. 1-116. In H. R. Lumsden and D. A. Evans (ed.), vol. 2. Academic Press Ltd., London.

Lerner EA, Ribeiro JM, Nelson RJ, Lerner MR. Isolation of Maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. 1991. J. Biol. Chem.266:11234.

Liew FYY & Millott S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in 5 leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by 6 nitric oxide from L-arginine. Immun. 1990; 71:556-559.

Lima AKC, Elias CGR, Souza JEO, Santos ALS, Dutra PML. Dissimilar peptidase production by avirulent and virulent promastigotes of *Leishmania braziliensis*: inference on the parasite proliferation and interaction with macrophages. Parasitology. 2009; 136, 1179–1191.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJ, Amendoeira MRR. Leishmaniose Visceral (Calazar). JBM.1981; 42:69-84.

Marzochi MCA, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira MF, Mouta-Confort E, Schubach AO, Marzochi. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco- epidemiological aspects and control. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2009; 42(5):570-580.

Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. JBM. 1992; 63: 82, 104.

Matos DCS, Faccioli LAP, Cysne-Finkelstein L, De Luca PM, Corte-Real S, Mendonça SCF, et al. Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* and its surface expression increases during metacyclogenesis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; Vol. 105(3): 341-347.

McConville MJ, Turco SJ, Ferguson MAJ, Sacks DL. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. The EMBO Journal.1992; vol. 11 no. 10 pp.3593 – 3600.

McNeely TB & Turco SJ . Requirement os lipophosphoglycan for intracellular survival os *Leishmania donovani* within human monocytes. J.immunol.1990; 144,2745-2750.

McNicoll F, Drummelsmith J, Müller M, Madore E, Boilard N, Ouellette M, Papadopoulou B. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics*; 2006, 6, 3567–3581.

Mendonça SC, Russell DG, Coutinho SG. Analysis of the human T cell responsiveness to purified antigens of *Leishmania*: lipophosphoglycan (LPG) and glycoprotein 63 (gp 63). *Clin Exp Immunol*. 1991; 83: 472-8.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana diagnósticos clínico e diferencial. Brasília: MS; 2006.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2007. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 182 p.

Moreno J, Cañavate C, Alvar J. Virulence and disease in leishmaniasis: what is relevant for the patient? *Trends Parasitol*. 2004; Vol.20, N°7.

Mottram JC, Coombs GH, Alexander J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr. Opin. Microbiol*. 2004; 7, 375–381.

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

Mukhopadhyay S, Sen P, Majumder HK, Roy S. Reduced expression of lipophosphoglycan (LPG) and kinetoplast membrane protein (KMP)-11 in *Leishmania donovani* promastigotes in axenic culture. *J Parasitol*. 1998; 84: 644-647.

Murray PJ, Handman E, Glaser TA, Spithill TW. *Leishmania major*: expression and gene structure of the glycoprotein 63 molecule in virulent and avirulent clones and strains. *Exp. Parasitol*. 1990; 71, 294-304.

Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. *Parasitologia Humana*, 11ª edição. Ed. Atheneu, 2005.

Nunes WS, Araújo SR, Calheiros CML. Epidemiological profile of leishmaniasis at a reference service in the state of Alagoas, Brazil, from January 2000 to September 2008. *Braz J Infect Dis*. 2010; 14(4):342-345.

Ohl F, Jung M, Radonić A, Sachs M, Loening SA, Jung K. Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies of human bladder cancer. *J Urol*. 2006;175(5):1915-20.

Osorio y Fortea J, Prina E, de La Llave E, Lecoeur H, Lang T, Milon G. Unveiling pathways used by *Leishmania amazonensis* amastigotes to subvert macrophage function. *Immunol. Rev*. 2007 ; 219, 66–74.

Ouakad M, Bahi-Jaber N, Chenik M, Dellagi K, Louzir H. Selection of endogenous reference genes for gene expression analysis in *Leishmania major* developmental stages. *Parasitol Res*. 2007 ;101(2):473-7.

Padigel UM, Alexander J, Farrell JP. The Role of Interleukin-10 in susceptibility of BALB/c Mice to *Leishmania amazonensis* and *Leishmania mexicana*. *J. Immunol*. 2003;171; 3705-3710.

Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat. Genet*. 2007; 39, 839–847.

Pereira BAS & Alves CR. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Vet Parasitol*. 2008; 158; 239–255.

Pimenta PFP, Saraiva BEM, Sacks DL. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Exp. Parasitol*. 1991; Volume 72, Issue 2, Pages 191-204.

Prina E, Abdi SZ, Lebastard M, Perret E, Winter N, Antoine JC. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *J. Cell Sci.* 2004; 117, 315–325.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. 2009; Vienna, Austria.

Rabello E. Contribuições ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil . I - Origens, históricos, sinonímia. *Anuário Brasileiro de Dermatologia e Sifigrafia.* 1925; 1:3-29.

Ramamoorthy R, Donelson JE, Paetz KE, Maybodi M, Roberts SC, Wilson ME. Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of *Leishmania donovani chagasi* promastigotes to an infectious Form. *J. Biol. Chem.* 1992;Vol. 267, No. 3, Issue of January 25, pp. 18&-1895.

Ramírez JR, Berberich C, Jaramillo A, Alonso C, Vélez ID. Molecular and Antigenic Characterization of the *Leishmania (Viannia) panamensis* Kinetoplastid Membrane Protein-11. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998; Vol. 93(2): 247-254.

Ramírez JR, Gilchrist K, Robledo S, Sepúlveda JC, Moll H, Soldati D, et al. Attenuated *Toxoplasma gondii* ts-4 mutants engineered to express the *Leishmania* antigen KMP-11 elicit a specific immune response in BALB/c mice. *Vaccine.* 2001; 20(3-4):455-461.

Rebello KM, Britto C, Pereira BAS, Pita-Pereira D, Moraes MO, Ferreira AB, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Influence of successive in vitro cultivation on the expression of promastigote proteinases. *Exp. Parasitol.* 2010; Volume 126, Issue 4, Pages 570-576.

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

Ritz C & Spiess AN. qpcR: an R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. *Bioinformatics.* 2008; Vol. 24 no. 13, pages 1549–1551.

Rivas L, Moreno J, Canavate C, Alvar J. Virulence and disease in leishmaniasis: what is relevant for the patient? *TRENDS in Parasitology*. 2004; Vol.20 No.7.

Rodrigues IA, Silva BA, Santos ALS, Vermelho AB, Alviano CS, Rosa MSS. A new experimental culture medium for cultivation of *Leishmania amazonensis*: its efficacy for the continuous in vitro growth and differentiation of infective promastigote forms. *Parasitol Res*. 2010; 106(5):1249-52.

Rosenzweig D, Smith D, Myler PJ, Olafson RW, Zilberstein D. Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. *Proteomics*; 2008; 8, 1843–1850.

Russo DM, Turco SJ, Burns JM Jr, Reed SG. Stimulation of human T lymphocytes by *Leishmania* lipophosphoglycan-associated proteins. *J Immunol*. 1992; 148: 202-7.

Sacks DL & Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol*. 2001; 55:453–83.

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

Sacks DL, Saraiva EM, Rowton E, Turco SJ, Pimenta PF. The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. *Parasitology*. 1994; 108 Suppl: S55-62.

Sacks DL, Pimenta PFP, McConville MJ, Schneider P, Turco SJ. Stage-specific Binding of *Leishmania donovani* to the Sand Fly Vector Midgut Is Regulated by Conformational Changes in the Abundant Surface Lipophosphoglycan. *J. Exp. Med*. 1995; 9 Volume 181, 685-697.

Sádlova' J, Victoir K, Dujardin J, Voty'pka J. Virulent and attenuated lines of *Leishmania major*: DNA karyotypes and differences in metalloproteinase GP63. *Folia Parasitologica*. 2006; 53,81–90.

Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N. Immune responses in kala_azar. Indian J. Med. Res. 2006; 123(3):245-266.

Sánchez-Arcilla JC. Localização de determinantes antigênicos para respostas de células humanas em KMP-11 (“Kinetoplastid Membrane Protein-11”) de *Leishmania amazonensis* – Rio de Janeiro: 2010.

Saravia NG, Weigle K, Segura I, Giannini SH, Pacheco R, Labrada LA, Goncalves A. Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection - reactivation or reinfection? Lancet. 1990; 18: 398-402.

Segovia M, Artero JM, Mellado E, Chance ML. Effects of long-term in vitro cultivation on the virulence of cloned lines of *Leishmania major* promastigotes. Ann Trop Med Parasitol. 1992;86(4):347-54.

Sharma U & Singh S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. J Vector Borne Dis. 2008; 45(4):255-72.

Silva EM, Bertho AL, Mendonça SCF. Effect of in vivo depletion of CD4+ T cells on experimental infection of susceptible BLB/c mice with *Leishmania amazonensis*. Acta Trop. 1994; 56; 111-120.

Silva R. & Sacks DL. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. Infection and Immunity. 1987; p. 2802-2806. Vol. 55, No. 11.

Silveira FT, Lainson R, de Castro GCM, Laurenti MD, Corbett CEP. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunol. 2009; 31, 423–431.

Simpson AGB, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. Trends Parasitol. 2006; 22(4):168-174.

Siviero do Vale EC & Furtado T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. An Bras Dermatol. 2005; 80(4):421-8.

Small BC, Murdock CA, Bilodeau-Bourgeois AL, Peterson BC, Waldbieser GC. Stability of reference genes for real-time PCR analyses in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) tissues under varying physiological conditions. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2008; 151(3):296-304.

Soares, RMA, Santos ALS, Bonaldo MC, Andrade AFB, Alviano CS, Angluster J, Goldenberg S. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: differential expression of proteinases and cell-surface polypeptides in avirulent and virulent promastigotes. *Exp Parasitol*. 2003; 104, 104–112.

Stebeck CE, Beecroft RP, Singh BN, Jardim A, Olafson RW, Tuckey C, et al. Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1995; 71(1):1-13.

Stebeck CE, Baron GS, Beecroft RP, Pearson TW. Molecular characterization of the kinetoplastid membrane protein- 11 from African trypanosomes. *Mol. Biochem Parasitol*. 1996; 81, 81-88.

Theillin O, Zorzi W, Lakaye, De Borman, Coumans B, Hennen G et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotech* 1999; 75 : 291–295.

Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol*. 1985; 7(5): 545-55.

Tolson DL, Jardim A, Schnur LF, Stebeck C, Tuckey C, Beecroft RP, et al. The kinetoplastid membrane protein 11 of *Leishmania donovani* and African trypanosomes is a potent stimulator of T-lymphocyte proliferation. *Infect. Immun*. 1994; 62(11):4893-4899.

Turco SJ, Späth G, Beverley S. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends Parasitol*. 2001; Vol.17 No.5.

Vianna, G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (nota preliminar) Brasil Médico. 1911; 25: 411.

Webster P, Russell DG. The flagellar pocket of trypanosomatids. Parasitol. Today (Regul. Ed.). 1993; 9(6):201-206.

World Health Organization (WHO). [Internet] Essential leishmaniasis maps. World Health Organization (WHO) – Leishmaniasis [Internet]. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em 01/02/2011.

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

Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Andreas Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as Vector for a *Leishmania* Entry into Macrophages. J Immunol. 2004;173;6521-6525