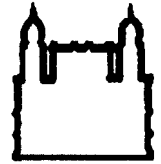




UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS CICINAS NA
INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR
*Leishmania chagasi***

ROBSON AMARO AUGUSTO DA SILVA

Salvador - Bahia - Brasil
2006



001643

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS CININAS NA INFECÇÃO DE
MACRÓFAGOS POR *Leishmania chagasi***

ROBSON AMARO AUGUSTO DA SILVA

ORIENTADORA: Dra. Cláudia Ida Brodskyn

Dissertação apresentada para a
Obtenção do grau de Mestre em
Patologia Experimental

Salvador-Bahia-Brasil
2005

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz /
FIOCRUZ - Salvador - Bahia

Silva, Robson Amaro Augusto da
S586 Avaliação do papel das cininas na infecção de macrófagos por *Leishmania chagasi*
[manuscrito]. / Robson Amaro Augusto da Silva. - 2006.
85 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina.
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2006.

Orientador: Dra. Cláudia Ida Brodskyn. Laboratório de Imunoparasitologia.

1. *Leishmania chagasi*. 2. Bradicininina. 3. Macrófagos. I. Título.

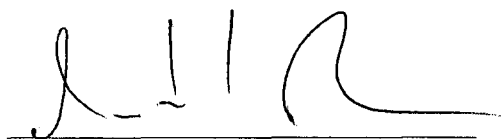
CDU 616. 993.161

AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS CININAS NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR
Leishmania chagasi

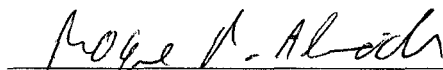
ROBSON AMARO AUGUSTO DA SILVA

FOLHA DE APROVAÇÃO

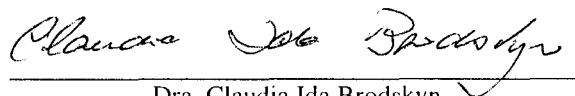
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Momtchilo Russo
Professor Titular
USP



Dr. Roque Pacheco de Almeida
Pesquisador Titular
HUPES



Dra. Claudia Ida Brodskyn
Pesquisadora Titular
CPqGM-FIOCRUZ

**A Deus por ter me concedido
sabedoria e a oportunidade
de realizar este trabalho.**

**Às minhas avós,
Lindalva Melo (*in memoriam*)
e Maria Belmira,
por todo amor concedido.**

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar comigo sempre.

À Cláudia Ida Brodskyn pela orientação e boa convivência.

À Aldina Barral e Manoel Barral pela acolhida no laboratório e apoio em todos os momentos.

A toda a minha família por todo amor, compreensão e apoio em todas as minhas decisões.

A Imbroinise Rafaelle, Lílian Afonso, Regis Gomes pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos meus amigos do LIP-LIMI e da pós-graduação pela ótima convivência e por toda ajuda direta e indireta que contribuiu para a realização do trabalho.

Ao Dr. Júlio Scharfstein pela colaboração intelectual de grande valor.

Aos professores da pós-graduação pelo bom empenho em suas atividades de ensino, bem como a Rosália e ao pessoal da secretaria da pós-graduação por toda ajuda fornecida.

A Eurydes, Ademário e família Carvalho pela amizade e apoio.

Aos funcionários do biotério pela boa relação e pelo fornecimento dos animais.

Aos funcionários da biblioteca por todo apoio concedido.

Ao CNPq, FAPESB e à FIOCRUZ.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Leishmaniose.....	14
1.2. Imunidade.....	18
1.3. Cisteino Proteases.....	22
1.4. Papel das Cininas na Infecção de Células do Hospedeiro.....	24
2. JUSTIFICATIVA.....	29
3. OBJETIVOS.....	30
3.1. Objetivo Geral.....	30
3.2. Objetivos Específicos.....	30
4. DESENHO EXPERIMENTAL.....	31
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
5.1. Animais.....	32
5.2. Cultura de <i>Leishmania chagasi</i>	32
5.3. Obtenção das culturas de células.....	32
5.4. Obtenção de Macrófagos de Peritônio.....	33
5.5. Curvas Dose Resposta a Bradicininina e ao Cininogênio.....	34
5.6. Inibição da Ação de Cisteína Proteases.....	34
5.7. Detecção de citocinas pelo método de ELISA.....	35
5.8. Análise Estatística.....	35
6. RESULTADOS.....	36
6.1 Curva Dose Resposta a Bradicininina.....	36
6.2. Curva Dose Resposta ao Cininogênio de Alto Peso Molecular.....	38
6.3. HOE-140 Reverte os Efeitos da Bradicininina.....	40
6.4. Inibidor de Cisteino Protease Previne o Aumento dos Índices de Infecção das Células por <i>L. chagasi</i>	43
6.5. Ativação do Receptor B ₂ da Bradicininina Promove Aumento da Susceptibilidade de Macrófagos a Infecção por <i>L. chagasi</i>	45
6.7. A Entrada de <i>Leishmanias</i> no Interior de Macrófagos Pode Ser Aumentada Pela Presença de Soro.....	48
6.8. Avaliação da Produção de Citocinas em Sobrenadantes de Cultura de Macrófagos J774 Infectados por <i>L. chagasi</i>	51
7. DISCUSSÃO.....	53
8. CONCLUSÕES.....	63
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
10. ANEXO- ARTIGO.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

AM- Aminopeptidase

APC- Células Apresentadoras de Antígenos

BK-Bradicinina

CP- Cisteino Protease

CP- Carboxipeptidases N e M (cininases I)

ECA- Enzima Conversora de Angiotensina

ELISA- Ensaio Imunoenzimático

H&E- Hematoxilina & Eosina

HK- Cininogênio de alto peso molecular;

IL-2-Interleucina 2

IL-4- Interleucina 4

IL-5- Interleucina 5

IL-6- Interleucina 6

IL-10- Interleucina 10

IL-12- Interleucina 12

IL-13- Interleucina 13

INF- γ - Interferon gama

IP3- Inositol Trifosfato

K11777-N-metilpiperazina-urea-Phe-homoPhe-vinilsulfona-benzeno

LPS-Lipolissacarídeo

LK- Cininogênio de baixo peso molecular

LV- Leishmaniose visceral

NEP- Endopeptidases Neutras

NK- "Natural killer"

PGE2- Prostaglandina E2

PIP2- Fosfatidilinositol bifosfato

PK- Calicreína plasmática

RNA- Ácido Ribonucléico

SBF- Soro Bovino Fetal

Th1- "T helper 1"

Th2- "T helper 2"

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TGF- β - Fator de crescimento transformador beta

TK- Calicreína tissular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp. (modificado de www.wehi.edu.au).	15
Figura 2. Representação esquemática do sistema calicreínas-cininas.	24
Figura 3. Curva dose resposta à bradicinina.....	35
Figura 4. Curva dose resposta ao cininogênio.....	37
Figura 5. Efeito do HOE-140 na invasão de macrófagos por <i>L. chagasi</i>	39
Figura 6. Fagocitose de Zimosam por macrófagos murinos.....	40
Figura 7. Pré-tratamento de <i>L. chagasi</i> com inibidor de cisteino protease.....	42
Figura 8. Destino das <i>Leishmanias</i> fagocitadas por macrófagos na presença de cininas..	44
Figura 9. Pré-tratamento de <i>L. chagasi</i> com inibidor de cisteino protease.....	45
Figura 10. Efeito do soro na infecção de macrófagos por <i>L. chagasi</i>	47
Figura 11. Efeito do soro na infecção de macrófagos por <i>L. chagasi</i>	48
Figura 12. Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura.....	50

RESUMO

AValiação DO PAPEL DAS CININAS NA INFEcÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania chagasi*. ROBSON AMARO AUGUSTO DA SILVA. A leishmaniose visceral é uma doença sistêmica causada por protozoários que fazem parte do complexo *Leishmania donovani*. Fagócitos mononucleares constituem uma população de células heterogêneas com uma ampla variedade de fenótipos, diferenciação funcional participando tanto da imunidade inata como da adaptativa. Cisteino proteases de parasitos estão engajadas em vários processos como alimentação, infecção de células do hospedeiro e evasão da resposta imune. Cininas são peptídeos inflamatórios e que recentemente têm sido envolvidas em fenômenos de invasão. Neste trabalho, avaliamos o papel das cisteino proteases da *L. chagasi* na interação com o sistema das cininas, no processo de entrada e multiplicação dos parasitos no interior de macrófagos de hamsters e camundongos BALB/c. [MATERIAL E MÉTODOS] Macrófagos de baço e peritônio foram isolados por adesão em placa de cultura de células, sendo infectados com *Leishmania chagasi* (5:1) por quatro horas adicionando-se ao meio captopril, bradicinina, cininogênio e HOE-140 e/ou realizando pré-tratamento das *Leishmanias* com N-metilpiperazina-urea-Phe-homoPhe-vinilsulfona-benzeno (VS) quando necessário. As células foram fixadas, coradas com H&E e avaliadas por microscopia óptica. Os sobrenadantes das culturas foram coletados e avaliados por ELISA quarenta e oito horas após o experimento de invasão. [RESULTADOS] As taxas de infecção se mostraram significativamente aumentadas quando cininogênio ou bradicinina foi adicionada aos meios de cultura. Nestas condições, observou-se produção de IL-10 em sobrenadantes de cultura de células J774. Estes efeitos foram revertidos pelo antagonista do receptor B2 da bradicinina (HOE-140) e pela VS. A ativação do receptor B2 da bradicinina aumentou a proliferação de *Leishmanias* no interior de macrófagos esplênicos 72 horas após a infecção. [CONCLUSÃO] Estes resultados indicam que a sinalização pelo receptor de bradicinina pode ser utilizada pela *Leishmania chagasi* nas primeiras etapas da infecção, podendo ser de fundamental importância para o estabelecimento do parasita.

PALAVRAS CHAVE: *Leishmania chagasi*. Macrófagos. Leishmaniose Visceral. Bradicinina, Infecção.

ABSTRACT

EVALUATION OF KININ SYSTEM IN MACROPHAGE INFECTION BY *Leishmania chagasi*. **ROBSON AMARO AUGUSTO DA SILVA.** Visceral leishmaniasis is a systemic disease caused by protozoa parasites from *Leishmania donovani* complex. Mononuclear phagocytes participate both in innate and adaptative immunity. Parasite cysteine proteases are engaged in different process such as feeding, host cell infection and immune response evasion. Kinins are inflammatory peptides that have been recently involved in invasion phenomenon. In the present study, we evaluated the role of bradykinin in macrophage infection by *L. chagasi*. [METHODS] Hamster and mouse macrophages were isolated from spleen and peritoneum by adherence in tissue culture plates. Cells were infected by *L. chagasi* at (5:1) ratio for four hours adding to cultures captopril, bradykinin, kininogen, HOE-140 or N-metilpiperazina-urea-Phe-homoPhe-vinilsulfona-benzeno (VS) to evaluate different parameters. Phagocytes were fixed and stained with H&E. Culture supernatants of J774 cells were collected and evaluated by ELISA 48 hours after infection. [RESULTS] Infection rate were evaluated by optical microcopy 4 and 72 hours after infection. Infection rate was significantly enhanced when kininogen and bradykinin were added to culture. In these conditions J774 cells produce IL-10 48 hour after infection. Addition of bradykinin receptor antagonist HOE-140 and/or pre-treatment of *Leishmania* with VS, a inhibitor of cysteine proteases, reverted these effects. Activation of B₂ receptor enhanced *L. chagasi* growth into macrophage 72 hours after infection. [CONCLUSION] These results indicate that *L. chagasi* might use the kinin receptor-signaling pathway in the first steps of infection.

KEYWORDS: *Leishmania chagasi*, macrophages, Visceral Leishmaniasis, Bradykinin, Infection.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

Por afetar 12 milhões de indivíduos em todo o mundo, a leishmaniose é uma doença parasitária de grande importância para a saúde pública. Aproximadamente 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco desta infecção, principalmente aquelas residentes em áreas tropicais e subtropicais do planeta (WHO, 2000). Mais de dois milhões de novas infecções são reportadas anualmente, sendo que na última década o número de casos nas áreas endêmicas tem aumentado significativamente. Esta parasitose é uma doença que se caracteriza por ter um amplo espectro de formas clínicas, variando desde uma infecção assintomática até a forma tegumentar (cutânea e/ ou mucosa) ou visceral. A forma e a severidade da doença dependem da espécie de *Leishmania* e do estado imunológico do organismo (CUNNINGHAM, 2002). Atualmente acredita-se que, a disseminação da leishmaniose para algumas áreas não endêmicas do mundo pode está relacionada com a co-infecção pelo HIV (WHO, 2004).

O gênero *Leishmania*, um grupo de protozoários flagelados da família Triponosomatidae, ordem Kinetoplastida, tem formas morfológicas diferentes nas várias etapas do seu ciclo de vida – amastigota, promastigota. A amastigota possui forma redonda ou oval com ausência de flagelo, podendo ser encontrada dentro do vacúolo lisossomal presente nas células fagocitárias do organismo vertebrado. Estas células podem ser monócitos e/ou macrófagos que são ingeridos pelas fêmeas dos flebotomíneos quando se alimentam de sangue contaminado (DE ALMEIDA *et al.*, 2003), enquanto que as formas

promastigotas são extracelulares, móveis, estando presente no trato digestivo do inseto flebotômico, e são inoculadas juntamente com saliva no momento do repasto sanguíneo (Figura 1).

A leishmaniose é transmitida pela picada de insetos dos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (NEVES *et al.*, 2000) infectados com o parasita, durante o repasto sanguíneo em hospedeiros mamíferos e outros animais. No momento do repasto sanguíneo, promastigotas metacíclicas são inoculadas na pele do hospedeiro juntamente com produtos da glândula salivar (TITUS & RIBEIRO, 1998). Há aproximadamente 21 espécies de *Leishmanias*, transmitidas por aproximadamente 30 espécies de flebótomos (CUNNINGHAM, 2002).

As formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos e se instalam no interior de fagolisossomos, onde se diferenciam em formas amastigotas, sobrevivendo e multiplicando-se rapidamente (REY, 1991). A *Leishmania* tem desenvolvido uma variedade de mecanismos de adaptação, não somente para sobreviver no interior do inseto, mas também, para evadir da resposta imune do hospedeiro vertebrado, e assim permitir a sua sobrevivência dentro do macrófago (DE ALMEIDA, 2003; CUNNINGHAM, 2002).

Entre as formas clínicas das leishmanioses, a leishmaniose visceral (LV) ou calazar constitui uma das formas mais grave, pois, quando não tratada adequadamente leva a elevados índices de letalidade. Embora amplamente distribuída no mundo, ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Oriente Médio, África e Américas (GRIMALDI *et al.*, 1989). Espécies que podem causar leishmaniose visceral pertencem ao subgênero *L. (Leishmania)* sendo *L. donovani* e *L. infantum* presentes no Velho Mundo e *L. chagasi* no Novo Mundo. Embora diferentes no nome e origem geográfica, estudos moleculares têm sugerido que *L. infantum* e *L. chagasi* pertencem a

mesma espécie (MAURÍCIO *et al.*, 2000). *L. donovani* e *L. infantum/chagasi* usualmente causam disseminação da doença em humanos e a maioria dos casos de leishmaniose visceral pode ser atribuída a elas. Entretanto, existe considerável sobreposição das manifestações clínicas causadas pelo gênero *Leishmania*, ocorrendo casos reportados de lesões cutâneas causadas por *L. chagasi* e casos de leishmaniose visceral causadas por *L. amazonensis* (BARRAL, 1991) e *L. tropica* (DE ALMEIDA *et al.*, 2003).

Leishmaniose visceral (LV) causada por *L. chagasi* é endêmica em algumas áreas do Brasil, entretanto, a maioria das infecções nestas regiões é subclínica (assintomática). A LV é caracterizada por grande multiplicação do parasita na medula óssea, fígado e baço, conduzindo a uma severa perda de peso, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia, e trombocitopenia. O desenvolvimento da doença clínica é possivelmente relacionado com o estado nutricional, idade entre outros fatores (BARRAL *et al.*, 2000).

1.2. Imunidade

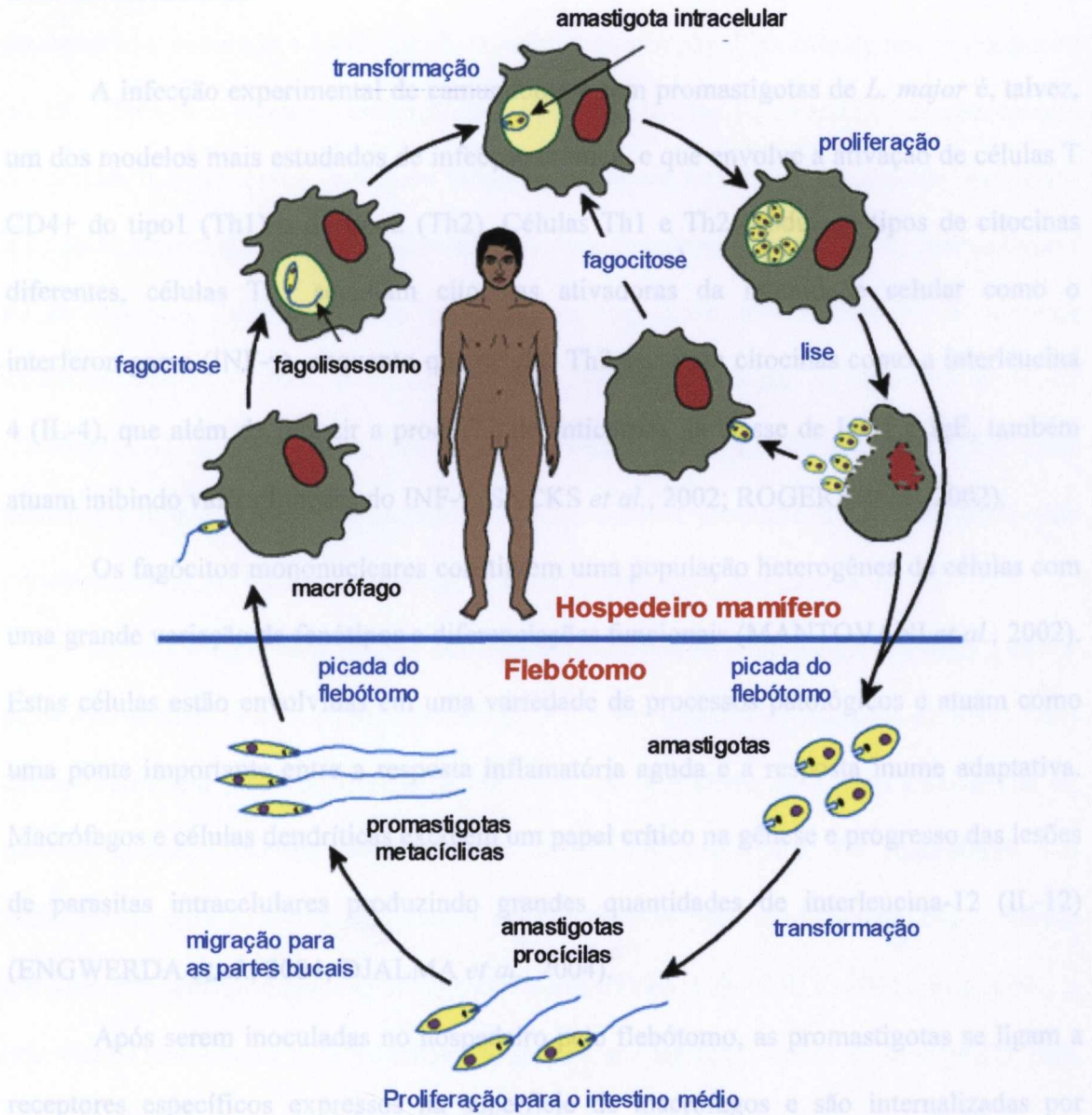


Figura 1 – Ciclo biológico de *Leishmania* spp. (modificado de www.wehi.edu.au).

1.2. Imunidade

A infecção experimental de camundongos com promastigotas de *L. major* é, talvez, um dos modelos mais estudados de infecção crônica, e que envolve a ativação de células T CD4⁺ do tipo1 (Th1) e do tipo2 (Th2). Células Th1 e Th2 produzem tipos de citocinas diferentes, células Th1 secretam citocinas ativadoras da imunidade celular como o interferon gama (INF- γ), enquanto que células Th2 secretam citocinas como a interleucina 4 (IL-4), que além de induzir a produção de anticorpos da classe de IgG1 e IgE, também atuam inibindo várias funções do INF- γ (SACKS *et al.*, 2002; ROGERS *et al.*, 2002).

Os fagócitos mononucleares constituem uma população heterogênea de células com uma grande variação de fenótipos e diferenciações funcionais (MANTOVANI *et al.*, 2002). Estas células estão envolvidas em uma variedade de processos patológicos e atuam como uma ponte importante entre a resposta inflamatória aguda e a resposta imune adaptativa. Macrófagos e células dendríticas exercem um papel crítico na gênese e progresso das lesões de parasitas intracelulares produzindo grandes quantidades de interleucina-12 (IL-12) (ENGWERDA *et al.*, 2004; DJALMA *et al.*, 2004).

Após serem inoculadas no hospedeiro pelo flebótomo, as promastigotas se ligam a receptores específicos expressos na superfície de macrófagos e são internalizadas por fagocitose mediada por receptor (ROSENTHAL *et al.*, 1996). Esta interação inicial é essencial para o estabelecimento da infecção no hospedeiro. Alguns autores têm mostrado evidências do envolvimento de uma série de ligantes e receptores, na adesão de promastigotas em macrófagos (BLACKWELL *et al.*, 1985; HANDMAN *et al.*, 1985; ROSENTHAL *et al.*, 1996). Embora promastigotas se liguem a macrófagos na ausência de soro, pelo receptor de manose, a ligação na maioria das vezes envolve receptores do

complemento (CR1 e CR3 (Mac-1)) (DESCOTEAUX & TURCO, 2002). Glicoconjugados de superfície, incluindo o LPG e gp63, também exercem papel importante nos processos de adesão. Embora a exata contribuição das várias moléculas de superfície de *Leishmania* envolvidas nos processos de adesão ainda necessite ser totalmente esclarecida, está claro que, tanto a utilização de CR1 como de CR3 pode favorecer a sobrevivência de promastigotas de *Leishmania*. Estes receptores promovem a fagocitose sem a ativação do estresse oxidativo. Além do mais, a ligação de CR3 resulta na inibição da produção de IL-12 (DESCOTEAUX & TURCO, 2002). Neste contexto, as promastigotas de *Leishmania* podem prevenir a ativação de macrófagos diminuindo a produção de óxido nítrico e de citocinas pró-inflamatórias incluindo IL-12 (DESCOTEAUX & TURCO, 2002).

Os macrófagos constituem o reservatório primário na leishmaniose cutânea e são as primeiras células a se tornarem infectadas após a inoculação dos parasitas na pele. Estas células fagocitam promastigotas de *Leishmania sp.* bem como as formas amastigotas do parasita quando liberadas pela lise das células do hospedeiro. Os macrófagos são responsáveis pela eficiente eliminação de *Leishmania* pela produção de óxido nítrico mediada por interferon gama (INF- γ) (revisto em STEBUT & UDEY, 2004). Entretanto, a infecção de macrófagos pelo parasitas não induz a sua ativação, e nem a sua migração para os linfonodos drenantes (UDEY, 2004).

Em contraste com os achados com os macrófagos, evidências recentes indicam que células dendríticas são células apresentadoras de antígeno (APC) relevantes para a resposta imune primária. A infecção de células dendríticas induz a sua maturação/ativação, ocorrendo uma diminuição da expressão de E-caderina, molécula esta que facilita a

aderência de células de Langerhans a queratinócitos na epiderme, e assim colaboram com a sua saída da epiderme e sua condução para os linfonodos (UDEY, 2004).

As citocinas são fatores críticos que regulam a diferenciação de células TCD4+, sendo a IL-12 um fator chave para a polarização Th1. Esta citocina é um heterodímero (p70) composto por p40 e p35. A sinalização pelo receptor da IL-12 induz, pela fosforilação da serina respostas biológicas mediadas por STAT4. A IL-12 leva a produção de INF- γ por linfócitos T e células NK (revisto em BASTOS *et al.*, 2004; UDEY, 2004). Desta forma, a IL-12 não é apenas um elemento conectivo entre células acessórias, mas uma molécula para a difusão de informação entre estas células.

Os roedores têm sido extensivamente utilizados como modelos de estudo da leishmaniose visceral, sendo que, nesses modelos têm se observado uma resposta imune tecido específica. Camundongos podem ser resistentes ou susceptíveis à infecção, mas mesmo animais susceptíveis podem apresentar cura de infecção (STEBUT *et al.*, 1998). Assim, constituem melhores modelos para se o estudo de infecções auto-limitantes ou subclínicas, do que a doença visceralizante disseminada. Ao contrário, hamsters desenvolvem doença progressiva, onde os parasitas se multiplicam no fígado, baço, e medula óssea causando, eventualmente, morte do hospedeiro (STEBUT *et al.*, 2000). Surpreendentemente, ocorre uma quantidade significativa de RNA mensageiro para citocinas do tipo Th1 como INF- γ , IL-2 e TNF- α no baço de hamsters infectados com *L. donovani* (UDEY, 2004). Embora pouco ou nenhum mRNA para IL-4 seja encontrado, quantidades apreciáveis de mRNA para TGF- β e IL-10 estão também presentes nos sítios de infecção desses animais.

Infelizmente, ainda não existem vacinas efetivas contra a leishmaniose. Assim o controle desta enfermidade é baseado principalmente na quimioterapia. A disponibilidade de fármacos é bastante limitada. O antimonial pentavalente tem sido utilizado por um longo tempo na terapia anti-*Leishmania* e ainda desempenha um papel chave no tratamento, mas a resistência a esta classe de fármacos está se tornando tão elevada em algumas partes do mundo, que vem se tornando obsoleta (OULLETTE *et al.*, 2004). Uma segunda linha de medicamentos, como a pentamidina e a anfotericina B, apresenta elevada toxicidade e grande custo, mostrando a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas de controle desta patologia. Para o desenvolvimento de novos fármacos destinados ao tratamento da leishmaniose é necessário o conhecimento das vias metabólicas utilizadas pelos parasitas, tanto para a entrada como para a sua sobrevivência nas células do hospedeiro. Atualmente, está bem estabelecido que proteases de parasitas são alvos promissores para o desenvolvimento de vacinas e medicamentos (McKERROW *et al.*, 1999). As proteases são hidrolases que catalisam a quebra de ligações entre aminoácidos de moléculas de proteínas e têm sido identificadas em sistemas biológicos de que vão desde vírus até vertebrados. Entre as várias proteases descritas, o grupo das cisteino proteases tem chamado a atenção pelo reconhecimento que sua participação é essencial para o ciclo de vida e patogenicidade de muitos parasitas (SAJID & McKERROW, 2002). Além disso, a maioria das proteases descritas em *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* e várias espécies de *Leishmanias* são cisteína proteases.

Em busca de um fármaco antiparasitário que possua uma alta atividade interferindo em mecanismos que sejam essenciais ao parasita sem, no entanto, causar danos ao hospedeiro, muitos autores têm analisado o papel das cisteino proteases nas interações do parasita com o hospedeiro, e assim explorando a possibilidade do uso terapêutico de

inibidores destas proteases. Existem várias razões para otimismo, entre elas, o fato desses inibidores afetarem a sobrevivência do microorganismo, bem como a existência de vários compostos inibidores disponíveis, sendo que alguns destes já estão sendo utilizados em estudos clínicos (COOMBS & MOTTRAM, 1997; FRAME., 2000).

1.3. Cisteino Proteases

Cisteino proteinases (CP) de parasitos têm sido implicadas em vários processos como diferenciação, nutrição, infecção de células do hospedeiro e evasão da resposta imune (KLIMBA *et al.*, 2002; SAJID *et al.*, 2002; ROSENTAL *et al.*, 1999). Vários relatos na literatura têm mostrado sua presença em *Trypanosoma cruzi* (NERY *et al.*, 1997), *Leishmania mexicana* (ALVES *et al.*, 2001) e *Leishmania donovani* (SOMANNA *et al.*, 2002). Em *Leishmania*, tanto cisteino como metaloproteases têm sido identificadas como fatores de virulência. Três “loci” de genes codificadores para cisteino proteases têm sido mostrados em *L. mexicana* como fatores de virulência. O gene *lmcpa* codifica uma protease catepsina sendo expresso em promastigotas metacíclicos e amastigotas. O gene *lmcpb* codifica uma CP cuja atividade é maior em amastigotas, enquanto que o gene *lmcpc* codifica uma catepsina expressa em todos os estágios do ciclo de vida do parasita. A localização em lisossomos do parasita aponta uma função de degradação protéica para estas enzimas (revisto em KLEMBBA & GOLDBERG, 2002). POLOCK e colaboradores (2003), demonstraram que, cisteino proteases de *L. mexicana* podem interferir no balanço Th1/Th2 devido à alta produção de IL-4, bem como apenas a forma ativa da enzima (CPB2.8) pode induzir a produção de IgE. Neste contexto, DENISE e colaboradores (2003), mostraram que a expressão de múltiplos genes codificando cisteino proteases é requerida para a

virulência do parasita *in vivo*, pois, cepas mutantes para esses genes causaram lesões menores em camundongos. Nestes animais, ocorre também uma menor produção de IL-4, confirmando os dados anteriores, onde cepas de *L. mexicana* deficientes em cisteino proteases, apresentam menor virulência, e de propiciam uma potente resposta Th1 com grande produção de IFN- γ e IL-2 (ALEXANDER *et al.*, 1998).

A cruzipaina constitui a principal cisteino protease expressa por *T. cruzi*. Sendo codificada por múltiplos genes, é expressa em todos os estágios do ciclo de vida do parasita. Essa enzima tem se mostrado de fundamental importância para a sobrevivência dos parasitas em macrófagos murinos levando a produção de elevadas quantidades de IL-10 e TGF- β , e portanto a uma diminuição da secreção de IL-12 (STEPIN *et al.*, 2002).

SCHNAPP e colaboradores (2002), mostraram que a cruzipaina induz respostas de linfócitos T e B no modelo murino de infecção pelo *T. cruzi*. Assim esta protease é importante como alvo de uma resposta imune mediada por anticorpos na mucosa e esses mecanismos de imunidade são relevantes na proteção contra parasitos transmitidos oralmente.

O papel de cisteino proteases como bons indutores de respostas imunes, bem como a demonstração de que cães assintomáticos para Leishmaniose Visceral apresentam respostas imunes, tanto humoral como celular, contra esses peptídeos (NAKHACE *et al.*, 2004), tem levado ao uso destas proteínas em tentativas de formulações de vacinas. Assim, foi mostrado que cisteino proteases de *L. infantum* podem proteger parcialmente quanto administradas com adjuvantes indutores de resposta Th1 (RAFATI *et al.*, 2004). Ainda no Complexo Donovani, foi demonstrado recentemente que cisteino proteases de *L. chagasi* também induzem respostas imunes pela ativação de linfócitos T, tanto em humanos como

em cães (PINHEIRO *et al.*, 2005). Esta protease chamada Ldcccys2 é expressa apenas no estágio de amastigota e tem se mostrado importante na sobrevivência desta forma de parasita no interior de macrófagos (MUNDODI *et al.*, 2005). Análises funcionais de CPs do Complexo Donovanii têm mostrado que essas enzimas podem clivar TGF- β latente transformando-o em TGF- β ativado e assim, contribuir para a desativação do macrófago (SOMANNA *et al.*, 2002).

1.4. Papel das Cininas na Infecção de Células do Hospedeiro

A análise do mecanismo de ação da cruzipaina revelou que esta proteína possui atividade proteolítica sobre polipeptídeos expostos na superfície celular, os cininogêneos (NERY *et al.*, 1997). O processamento de cininogênio de alto peso molecular pela cruzipaina é positivamente modulado pela interação com o heparan sulfato, exposto no glicocálix das células (LIMA *et al.*, 2002; RENNÉ *et al.*, 2005).

As cininas são peptídeos vasoativos e inflamatórios que induzem aumento de permeabilidade vascular, vasodilatação e aumento de sensibilidade à dor (hiperalgesia) (revisado em CASSIM *et al.*, 2002). Uma vez liberadas de seus precursores inativos, os cininogênios, as cininas ligam-se rapidamente a receptores acoplados a proteínas G regulatórias heterotriméricas, presentes em diversos tipos celulares (por exemplo, endotélio, músculo liso). Os cininogênios são glicoproteínas com multidomínios, sintetizadas nos hepatócitos e secretadas na circulação sanguínea. Em humanos, os cininogênios podem se apresentar sob duas formas: uma de alto peso molecular (*H-Kininogen*) e outra de baixo peso molecular (*L-Kininogen*). A molécula de cininogênio contém uma cadeia pesada e

outra leve (**Figura 2**), bem como uma seqüência de peptídeos que codificam cininas entre as duas cadeias (revisto em CASSIM *et al.*, 2002).

Bradicinina e lisil-Bradicinina são potentes peptídeos vasoativos liberados a partir dos cininogênios de alto peso molecular e baixo peso molecular, respectivamente, e que foram descritas pela primeira vez na década de 40 por Rocha e Silva (CASSIM *et al.*, 2002). Estas cininas participam ativamente na inflamação (LANDGRAF *et al.*, 2003; EDLESTON *et al.*, 2003), promovendo o aparecimento de seus sinais cardinais. São moléculas que participam no recrutamento de leucócitos (SHIGENATSU *et al.*, 1999), bem como induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias (SHIGEMATSU *et al.*, 2002). Além disso, as cininas participam em vários outros processos biológicos como, por exemplo, aumentam a secreção de renina pelos rins e estão também envolvidas em processos regulatórios da pressão arterial, diurese e excitabilidade neuronal revisado em (CASSIM *et al.*, 2002).

Pelo fato de estarem amplamente distribuídos no reino animal (COLON, 1999) e terem participação ativa em vários processos patológicos, os receptores de cininas têm sido amplamente estudados (MOEDA *et al.*, 1996; LANDGRAF *et al.*, 2003, KOUYONDJIAN *et al.*, 2005). Existem dois subtipos de receptores de cininas, com diferentes especificidades farmacológicas. Expresso constitutivamente, o receptor B2 (BHOOLA *et al.*, 1992), é ativado pela bradicinina ou lisil-bradicinina. Em contraste, o receptor B1 não é encontrado em tecidos normais, mas são induzidos por uma variedade de células no estado inflamatório (MARCEAU, 1998).

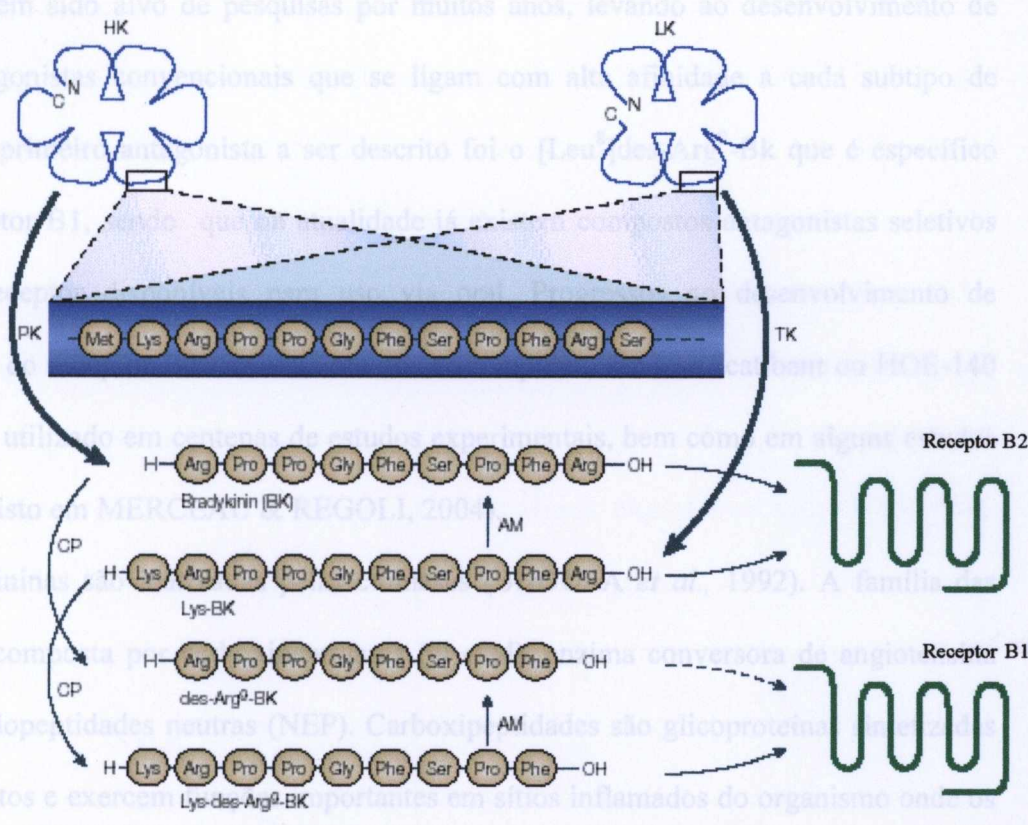


Figura 2. Representação esquemática do sistema caliceínas-cininas. Dois receptores acoplados a proteínas G, os receptores B1 e B2, fazem parte do sistema. Enzimas (ECA, também conhecida como cininase II, endopeptidases neutras e aminopeptidase P) clivam cininas em sítios diferentes, o que resulta em inativação biológica. ECA- Enzima conversora de angiotensina; AM- Aminopeptidase; CP- Carboxipeptidases N e M (cininases I); HK- Cininogênio de alto peso molecular; LK- Cininogênio de baixo peso molecular; PK- Caliceína plasmática; TK- Caliceína tissular. *Retirado de Marceau & Regoli, 2004.*

Quando ativados por agonistas, o receptor B₂ sofre internalização e recirculação da superfície das células, ao contrário, os receptores B₁ não são internalizados após estímulos por agonistas (MARCEAU *et al.*, 2002). O desenvolvimento de antagonistas dos receptores

de cininas tem sido alvo de pesquisas por muitos anos, levando ao desenvolvimento de drogas antagonistas convencionais que se ligam com alta afinidade a cada subtipo de receptor. O primeiro antagonista a ser descrito foi o [Leu⁸]des-Arg⁹-Bk que é específico para o receptor B₁, sendo que na atualidade já existem compostos antagonistas seletivos para este receptor disponíveis para uso via oral. Progressos no desenvolvimento de antagonistas do receptor B₂ têm sido obtidos com rapidez, sendo o Icatibant ou HOE-140 amplamente utilizado em centenas de estudos experimentais, bem como em alguns estudos clínicos (revisto em MERCEAU & REGOLI, 2004).

As cininas são inativadas pelas cininases (BHOOLA *et al.*, 1992). A família das cininases é composta por carboxipeptidases (N e M), enzima conversora de angiotensina (ECA) e endopeptidases neutras (NEP). Carboxipeptidases são glicoproteínas sintetizadas nos hepatócitos e exercem funções importantes em sítios inflamados do organismo onde os receptores B₁ são superexpressos. A ECA pode ser encontrada em altas concentrações nos pulmões, rins, intestino delgado, endotélio do miocárdio e placenta (revisto em CASSIM *et al.*, 2002) e atualmente possui vários inibidores disponíveis comercialmente, como por exemplo, o captopril, o enalapril e o ramiprilat. A NEP inativa as cininas removendo o dipeptídeo C-terminal Phe-Arg, sendo encontrada em altas concentrações nos pulmões, rins e intestino (revisto em CASSIM *et al.*, 2002).

A noção que a cruzipaina poderia atuar como enzima liberadora de cininas (LIMA *et al.*, 1997), o conhecimento que as cininas poderiam estimular o aumento das concentrações citoplasmáticas de cálcio via inositol trifosfato (IP₃) pela ativação de receptores acoplados a proteínas G na superfície de células de mamíferos (SCHARFSTEIN, 2003), além do fato do cálcio ser uma molécula importante em processos que levam à infecção de células do hospedeiro por parasitas (TARDIEX *et al.*, 1996; RUIZ *et al.*, 1998)

levaram a realização de uma série de estudos que mostram que a invasão de células do hospedeiro por *T. cruzi* é potencializada pela ativação de B₂R (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000; revisado em SCHARFSTEIN, 2003). A invasão do parasita foi intensificada na presença de inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), indicando que as cininas liberadas pela ação de cisteino proteases dos parasitas são rapidamente degradadas pelas peptidases presentes no soro ou superfície das células de mamíferos. Estudos sobre o mecanismo de geração de cininas sugeriram que estes resultam da ação proteolítica da cruzipaina sobre os precursores de cininas, os cininogênios, expostos na superfície celular. A análise do mecanismo de ação da cruzipaina (LIMA *et al.*, 2002) revelou que o processamento de cininogênio de alto peso molecular pela protease parasitária é positivamente modulado pela interação com heparan sulfato disposto na superfície celular. Estudos subsequentes demonstraram que as formas infectivas de *T. cruzi* ativam o sistema das cininas *in vivo*, sendo a reação inflamatória intensificada por inibidores da ECA.

2. JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose visceral (LV) tem como agente etiológico no Novo Mundo a *Leishmania chagasi*. Trabalhos recentes têm mostrado que Tripanosomatídeos como o *T. cruzi* podem utilizar cininas como proteínas sinalizadoras na entrada de células do hospedeiro. Assim, pretendemos neste estudo verificar se este tipo de interação também ocorre entre *L. chagasi* e células do hospedeiro. Utilizamos macrófagos de hamsters e camundongo por serem estes animais os mais utilizados como modelos animais de leishmaniose visceral. Verificamos inicialmente a influência do sistema das cininas na entrada dos parasitas nos macrófagos e a participação dos receptores B2R neste processo. Além disso, também observamos o papel das cisteino proteases presentes na *L. chagasi*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

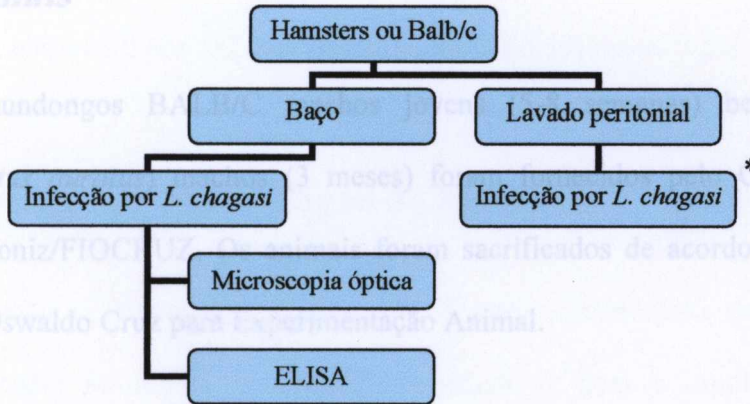
Avaliar o envolvimento do sistema das cininas na interação entre a *L. chagasi* e células do hospedeiro, utilizando macrófagos provenientes de hamsters (*Mesocricetus auratus*) e camundongos BALB/c (*Mus musculus*) como modelo experimental.

3.2. Objetivos Específicos

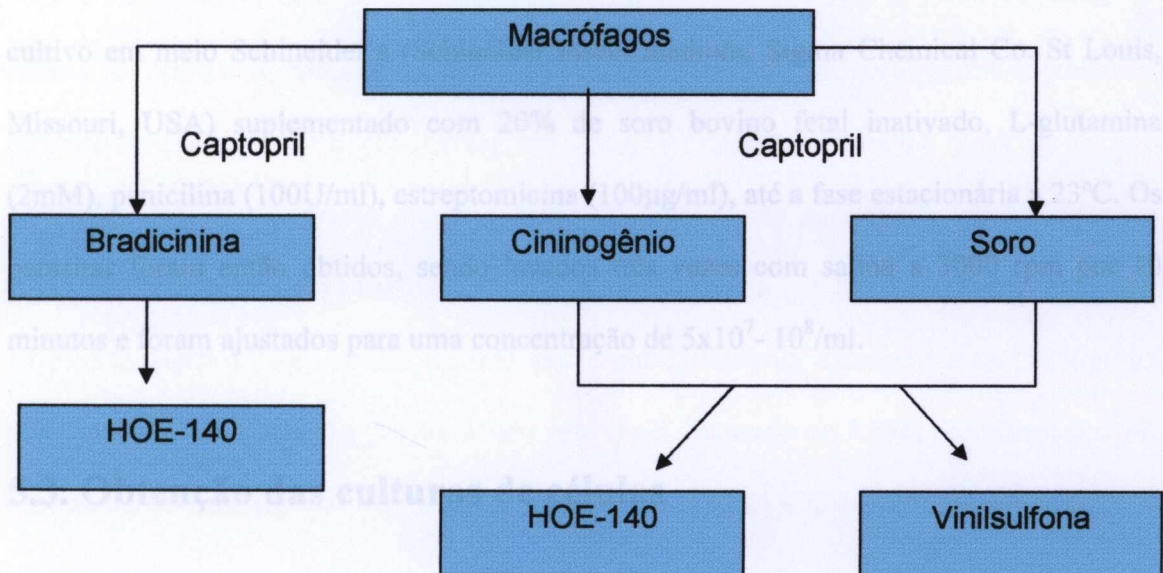
- 3.2.1. Verificar se a *L. chagasi* é capaz de ativar a cascata das cininas.
- 3.2.2. Avaliar se a liberação de cininas é bloqueada por ação de inibidores de cisteína proteinases.
- 3.2.3. Estudar a influência da bradicinina na infecção de macrófagos de hamsters e camundongos BALB/c utilizando inibidor da enzima conversora de angiotensina (captopril) e antagonista do receptor B2R (HOE-140).

4. DESENHO EXPERIMENTAL

5.1. Animais



5.2. Cultura de *Leishmania chagasi*



*- Condições avaliadas nos experimentos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais

Camundongos BALB/C machos jovens (5-8 semanas) bem como hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos (3 meses) foram fornecidos pelo Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ. Os animais foram sacrificados de acordo com as normas da Fundação Oswaldo Cruz para Experimentação Animal.

5.2. Cultura de *Leishmania chagasi*

Formas promastigotas *L. chagasi*, (MHOM/BR00/MER/Strain2) foram obtidas pelo cultivo em meio Schineider's (Schineider insect medium, Sigma Chemical Co. St Louis, Missouri, USA) suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado, L-glutamina (2mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100µg/ml), até a fase estacionária a 23°C. Os parasitas foram então obtidos, sendo lavados três vezes com salina a 3000 rpm por 10 minutos e foram ajustados para uma concentração de 5×10^7 - 10^8 /ml.

5.3. Obtenção das culturas de células

Baço de camundongos BALB/C foram macerados em meio RPMI (GIBCO, Grand Island, N.Y., USA) incompleto (sem soro bovino fetal). As células, assim obtidas, foram lavadas 3 vezes com salina, centrifugando-se por 10 minutos a 1500 rpm, foram então ressuspendidas em RPMI incompleto, contadas, plaqueadas numa concentração de 4×10^6 -

10×10^6 células/poço em placas de 24 poços (Costar, NY, USA) e cultivadas durante 4 horas para a adesão de macrófagos. As células não aderidas foram retiradas por lavagens sucessivas com salina sendo a placa cultivada em RPMI completo (com 10% de soro bovino fetal inativado) por 5-7 dias para diferenciação dos macrófagos.

5.4. Obtenção de Macrófagos de Peritônio

Hamsters e camundongos BALB/c foram anestesiados, sendo realizada uma pequena incisão na região inguinal, introduzindo-se com o auxílio de uma seringa descartável 10-15 ml de salina ou meio RPMI incompleto (sem soro) na cavidade peritoneal dos animais. As células residentes foram lavadas 3 vezes a 4°C, 1500 rpm por 10 minutos com salina e ressuspensas em 4-5 ml de RPMI incompleto. As células foram contadas em câmara de Neubauer, plaqueadas numa concentração de 10^6 células/poço sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços (Costar, NY, USA) e cultivadas durante 4 horas em estufa a 37°C, 5% CO₂ para a adesão de macrófagos. As células não aderidas foram retiradas por lavagens sucessivas com salina (37°C) e a placa cultivada em RPMI suplementado com HEPES (10µg/ml), L-glutamina (2mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100µg/ml), soro bovino fetal inativado (10%), sendo este meio chamado de RPMI completo, por 1-2 dias para diferenciação dos macrófagos, sendo então utilizados nos ensaios experimentais.

5.5. Curvas Dose Resposta a Bradicinina e ao Cininogênio

Os ensaios de invasão foram realizados com *Leishmania chagasi* numa proporção de 5:1 (*Leishmania*: macrófago). Captopril (Sigma) numa concentração de 25 μM foi adicionado ao meio de cultura RPMI incompleto (sem soro) 1 hora antes da adição da bradicinina ou do cininogênio (Sigma). Estes foram adicionados 5 minutos antes da adição da *Leishmania chagasi* nas concentrações de 5, 10, 50, 100, 300 nM. As culturas foram incubadas por 4 horas, lavadas com salina, fixadas e coradas com H&E.

5.6. Inibição da Ação de Cisteína Proteases

Os ensaios de invasão foram realizados utilizando-se *Leishmania chagasi* em uma proporção de 10:1 (*Leishmania*/macrófago). As *Leishmanias* foram pré-tratadas com o fenol de N-metilpiperazina-urea-Phe-homoPhe-vinilsulfona-benzeno ou K11777 (10 μM), inibidor de cisteino protease, por 10 minutos, lavadas com salina por 10 minutos a 3000 rpm. Captopril (25 μM) e HOE-140 (100 nM) foram adicionados ao meio de cultura (RPMI incompleto ou completo 1 hora antes da adição das *Leishmanias*). O cininogênio de alto peso molecular foi adicionado 5 min antes da adição dos parasitas. As culturas foram incubadas por 4 horas. Após a incubação, as culturas foram lavadas com salina, para retirada das *Leishmanias* que não penetraram nos macrófagos, e então fixadas e coradas com hematoxilina-eosina (H&E) e avaliadas por microscopia óptica. As taxas de infecção foram fornecidas em porcentagem e a cargas parasitárias foram fornecidas pela contagem de parasitas em cem células.

5.7. Detecção de citocinas pelo método de ELISA

As concentrações das citocinas presentes nos sobrenadantes de cultura foram determinadas pelo método imunoenzimático ELISA utilizando-se kits comerciais (BD PharMingen), de acordo com as recomendações do fabricante. IL-10 e IL-12 murinos recombinantes (PharMingen) foram utilizados para geração de curvas padrão. Os limites de detecção para estes testes são 15 pg/ml para interleucina 10 e 20 pg/ml para interleucina 12.

5.8. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e pelo Teste t de Student com intervalo de confiança de 95% sendo os valores considerados estatisticamente significantes quando $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Curva Dose Resposta a Bradicinina

Para se avaliar a concentração de bradicinina que induz o maior aumento na taxa de infecção e no número de parasitas nas células, uma curva dose resposta foi realizada. Os ensaios de invasão foram realizados com *Leishmania chagasi* numa proporção de 5:1 (*Leishmania*: macrófago). Captopril (Sigma) numa concentração de 25 μM foi adicionado ao meio de cultura RPMI incompleto 1 hora antes da adição da bradicinina (Sigma), sendo esta foi fornecida ao meio 5 min antes da adição das *Leishmanias* em concentrações que variaram de 5-300 nM. As culturas foram incubadas por 4 horas lavadas com salina, fixadas e coradas com H&E.

Como é possível observar na **Figura 3**, tanto a taxa de infecção (**3A**) como o número de parasitas no interior de macrófagos (**3B**) foi modificado pela adição da bradicinina de forma dose dependente. Doses muito elevadas (300nM) ocasionam uma redução estatisticamente significativa tanto do número de parasitas no interior das células como nas taxas de infecção, quando comparados com os experimentos onde a bradicinina foi fornecida em concentrações mais baixas. A dose de bradicinina foi escolhida como sendo aquela que induz maiores taxas de infecção e maior aumento do número de parasitas no interior dos macrófagos.

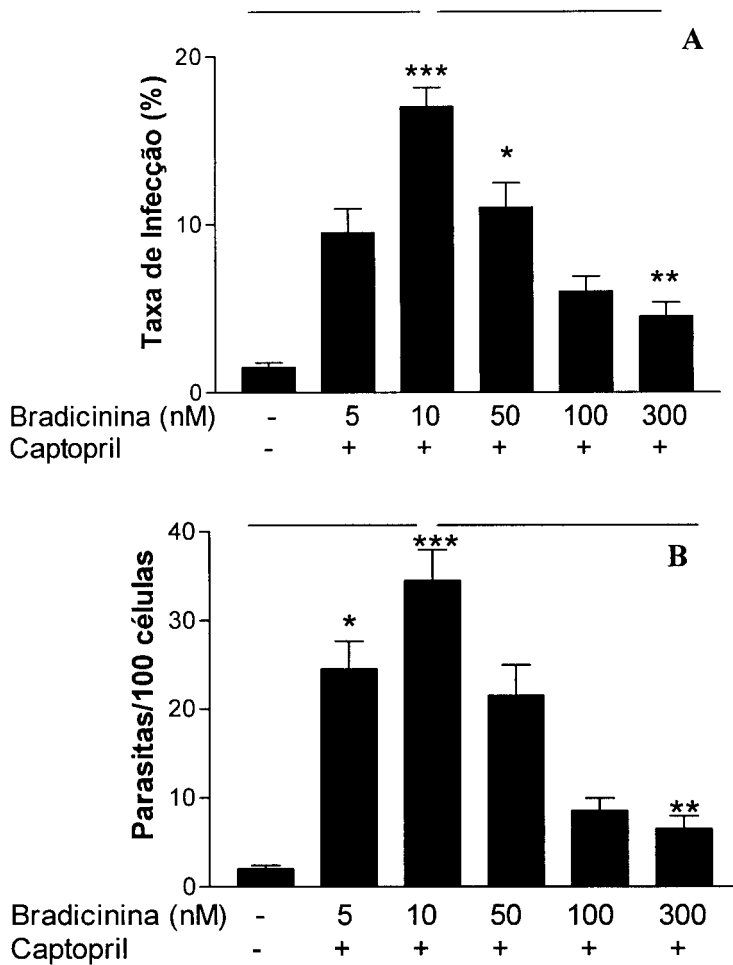


Figura 3. Curva dose resposta à bradicinina. Macrófagos de baço de camundongos BALB/c foram infectados por *L. chagasi* (5:1) em meio RPMI incompleto contendo captopril (25 μ M). Bradicininina foi fornecida em concentrações variando de 5-300 nM. Os macrófagos foram avaliados por microscopia óptica 4 horas após a infecção. A cultura foi realizada sobre lamínulas de 13 mm de diâmetro. **A-** Taxa de infecção de macrófagos murinos com diferentes concentrações de bradicininina. **B-** Dados mostram o número de parasitas em cem macrófagos contados. Onde *= $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. $n = 4$

6.2. Curva Dose Resposta ao Cininogênio de Alto Peso Molecular

Com o objetivo de verificar se enzimas produzidas por *L. chagasi* seriam capazes de clivar o precursor da bradicinina, o cininogênio de alto peso molecular, uma curva dose resposta ao cininogênio foi realizada. Os ensaios de invasão foram realizados com *Leishmania chagasi* numa proporção de 5:1 (*Leishmania*/macrófago). Captopril (Sigma) numa concentração de 25 μ M foi adicionado ao meio de cultura RPMI incompleto 1 hora antes da adição do cininogênio (Sigma), sendo fornecido ao meio 5 min antes da adição das *Leishmanias* em concentrações variando de 5-300 nM. As culturas foram incubadas por 4 horas, lavadas com salina, fixadas e coradas com H&E.

Como observado na **figura 4**, tanto a taxa de infecção como o número de parasitas no interior de macrófagos pode ser influenciado pela suplementação do meio com cininogênio de forma dose dependente, assim como ocorre com a bradicinina. Doses muito elevadas de cininogênio (300nM) ocasionam redução estatisticamente significativa tanto do número de parasitas como as taxas de infecção dos macrófagos quando comparados com a dose de cininogênio que provocam maiores índices de infecção (30nM). Experimentos realizados com a adição de cininogênio, na ausência de captopril, não mostraram diferenças significantes entre os grupos avaliados (dados não mostrados).

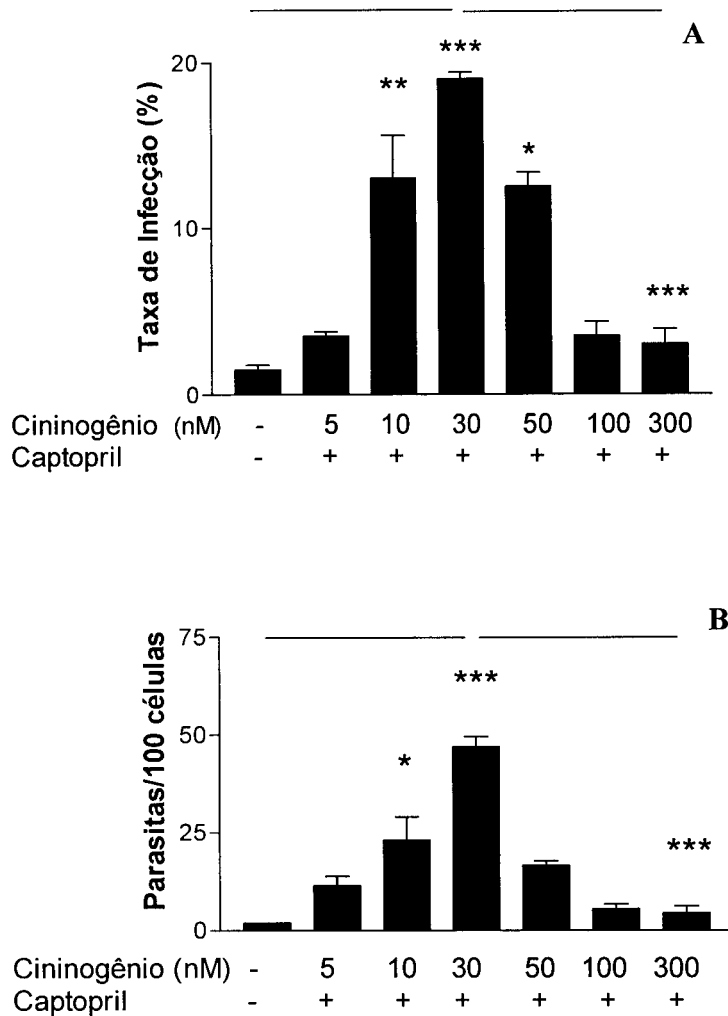


Figura 4. Curva dose resposta ao cininogênio de alto peso molecular. Macrófagos de baço de camundongos BALB/c foram infectados por *L. chagasi* em meio RPMI incompleto contendo captopril (25 μ M). Cininogênio de alto peso molecular foi fornecido em concentrações variando de 5-300 nM. As células foram fixadas e coradas por H&E e avaliadas por microscopia óptica 4 horas após a infecção. A cultura foi realizada sobre lamínulas de 13 mm de diâmetro. **A-** Taxa de infecção de macrófagos murinos com diferentes concentrações de cininogênio. **B-** Dados mostram o número de parasitas em cem macrófagos contados. Onde *= $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. $n = 4$

6.3. HOE-140 Reverte os Efeitos da Bradicinina

Para verificarmos se o aumento nas taxas de infecção e no número de parasitas no interior das células infectadas era devido à ativação dos receptores das cininas, um fármaco antagonista seletivo para o receptor B₂ da bradicinina, foi utilizado nos experimentos (HOE-140). Observamos que a suplementação do meio com HOE-140 (100nM) pode reverter o aumento da invasão de macrófagos por *L. chagasi* em condições onde a bradicinina está presente. Nossos dados demonstram também, que em condições onde temos a presença do cininogênio de alto peso molecular também ocorre uma redução estatisticamente significativa tanto nas taxas de infecção como no número de parasitas no interior das células, quando as culturas foram avaliadas 4 horas após o experimento de invasão (**Fig. 5A e 5B**). Resultados semelhantes foram obtidos independente da origem dos macrófagos utilizados para a infecção por *Leishmanias*, ou seja, estas células foram obtidas, de baço e peritônio de hamster ou de baço ou peritônio de BALB/c. A ativação dos receptores de B₂ de cininas aumenta os índices de infecção, enquanto que, o uso de antagonistas seletivos do receptor B₂ da bradicinina inibe estes efeitos (**Fig. 5C e 5D**). Com o objetivo de confirmar que este fenômeno é específico do parasita, experimentos com zimosam foram também realizados (**Fig. 6**) sob as mesmas condições experimentais.

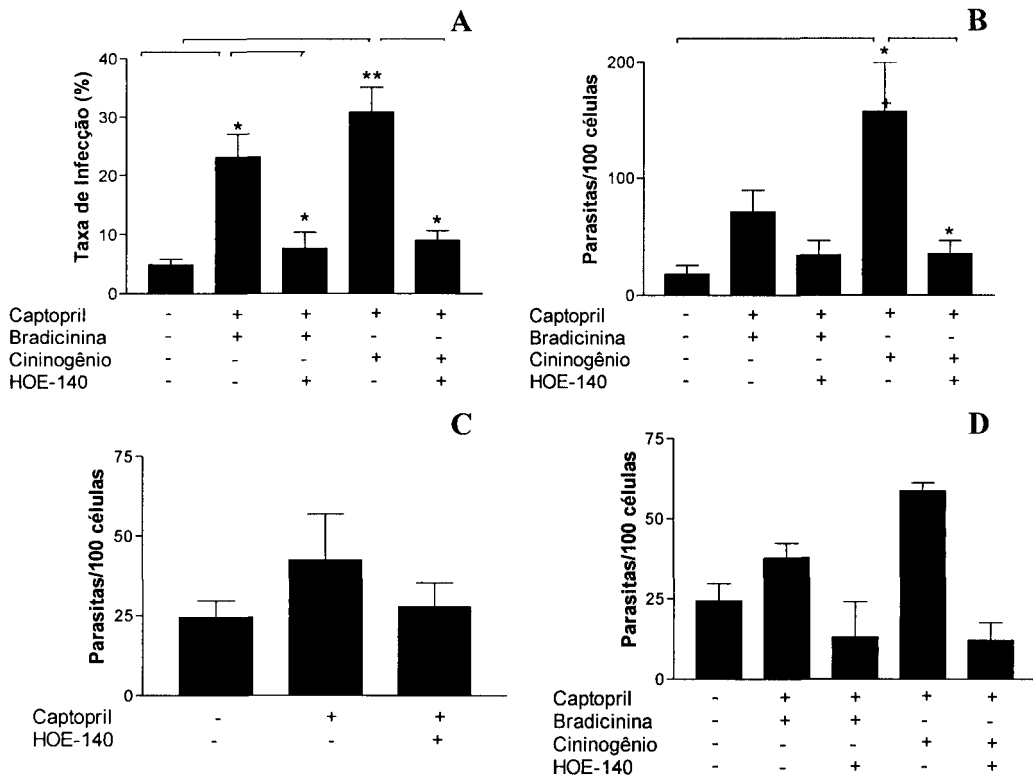


Figura 5. Efeito do HOE-140 na invasão de macrófagos por *L. chagasi*. Macrófagos obtidos de baço e peritônio de hamsters. Os macrófagos foram infectados por *L. chagasi* (5:1). A cultura foi realizada sobre lamínulas de 13 mm de diâmetro. As culturas foram fixadas e coradas por H&E 4 horas após a infecção e avaliadas por microscopia óptica. **A.** Taxa de infecção de macrófagos de baço de hamster. **B.** Número de parasitas por cem macrófagos de baço de hamster. **C e D-** Número de parasitas/cem macrófagos residentes provenientes de peritônio de hamster. Onde *=p<0.05, **=p<0.01. n=5

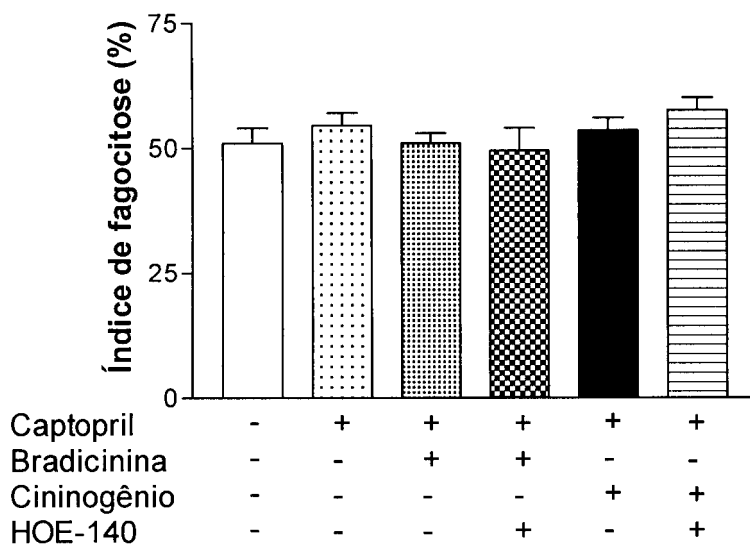


Figura 6. Fagocitose de zimosam por macrófagos residentes peritoneais murinos. Macrófagos foram cultivados em laminulas de vidro 13 mm de diâmetro a uma concentração de 10^6 /poço. Cinco partículas de zimosam foram fornecidas ao meio de cultura para cada macrófago ficando em contato com estes por 15 minutos a 37 °C. As culturas foram lavadas com salina, fixadas com metanol, coradas por HE e avaliadas por microscopia óptica. Quando necessário os meios foram suplementados com Captopril (25 μ M), cininogênio (30 nM), bradicinina (10 nM) e HOE-140 (100 nM). n=2

6.4. Inibidor de Cisteino Protease Previne o Aumento dos Índices de Infecção das Células por *L. chagasi*

Devido à demonstração da capacidade da *L. chagasi* em clivar precursores da bradicinina, e utilizar este peptídeo aumentando a sua entrada no interior de macrófagos nos primeiros momentos da infecção, o fenol de N-metilpiperazina-urea-Phe-homoPhe-vinilsulfona-benzeno ou K11777, um inibidor sintético de cisteino proteases com grande seletividade e especificidade à cruzipaina, foi utilizado. A existência de relatos prévios com *Trypanosoma cruzi* mostrando que o receptor B2 da bradicinina pode ser utilizado como porta de entrada nas células do hospedeiro, estimularam a realização desses experimentos. O K11777 possui grande seletividade para a cruzipaina, a principal cisteína protease de *T. cruzi*.

Macrófagos de baço de camundongos BALB/c foram infectados por *L. chagasi* na fase estacionária numa proporção de 10:1 (*Leishmania*/macrófago) em meio sem soro bovino fetal (**Figura 7**). O aumento das taxas de infecção (**Fig. 7A**) e do número de parasitas no interior das células avaliadas 4 horas após os experimentos de invasão (**Fig. 7B**) permanecem nos níveis basais quando as *Leishmanias* são pré-tratadas com K11777 (10 μ M) por 10 minutos, antes de entrar em contato com macrófagos, demonstrando assim que cisteino proteases presentes na *L. chagasi* são importantes e responsáveis pelo aumento nas taxas de infecção observadas anteriormente.

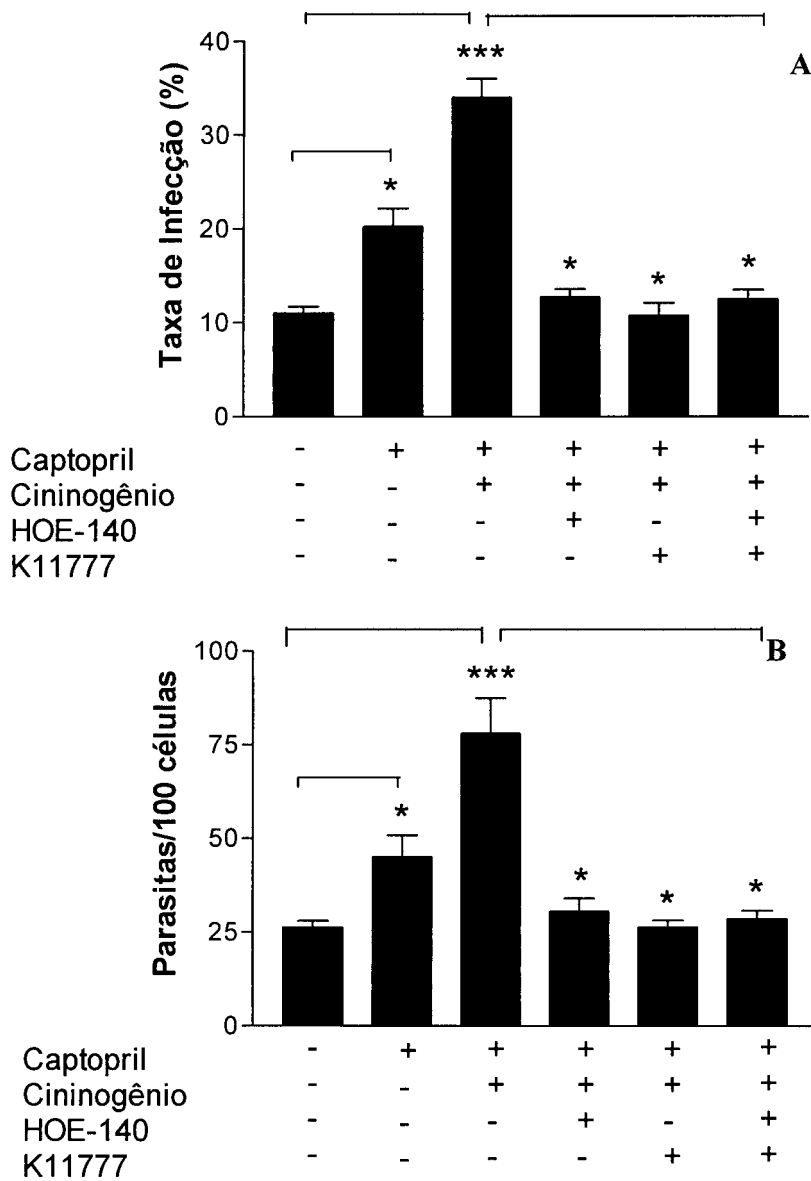


Figura 7. Pré-tratamento de *L. chagasi* com inibidor de cisteino protease. As *Leishmanias* foram pré-tratadas com K11777 (10 μ M), lavadas e utilizadas nos experimentos. Macrófagos de baço de BALB/c foram infectados e avaliados por microscopia óptica 4 horas após a infecção. A cultura foi realizada sobre lamínulas de 13 mm de diâmetro. **A.** Taxa de infecção de macrófagos de baço de BALB/c. **B.** Número de parasitas no interior de cem macrófagos contados. *=p<0.05, ***=p<0.001. n=4

6.5. Ativação do Receptor B₂ da Bradicinina Promove Aumento da Susceptibilidade de Macrófagos a Infecção por *L. chagasi*

A ativação dos receptores B₂ da bradicinina causa um aumento da entrada de *Leishmania chagasi* em macrófagos, tanto peritoniais como aqueles obtidos a partir de baço murino ou de hamster. Com o objetivo de avaliar se a ativação desses receptores também causava o aumento da proliferação desses parasitas no interior das células, culturas de células enriquecidas em macrófagos foram obtidas, infectadas com *L. chagasi* na proporção 5:1 (*Leishmania*/macrófago) e acompanhadas por 72 horas após a infecção. Observamos que após 72 horas ocorre um aumento no número de parasitas nos macrófagos tratados com captopril mais cininogênio. A suplementação do meio com o antagonista seletivo do receptor da bradicinina (HOE-140) reverte os efeitos causados tanto pela bradicinina fornecida ao meio, como a gerada no momento da entrada do parasita nas células pela clivagem enzimática do cininogênio de alto peso molecular (**Fig. 8A e 8B**). O inibidor de cisteino protease N-metilpiperazina-urea-Phe-homoPhe-vinilsulfona-benzeno ou K11777 preveniu este aumento, como observado na taxa de infecção como no número de parasitas . Entretanto, o pré-tratamento das *Leishmanias* com o K11777 associado a suplementação de HOE-140 ao meio, não provoca diminuição adicional dos índices de infecção (**Fig. 9A e 9B**).

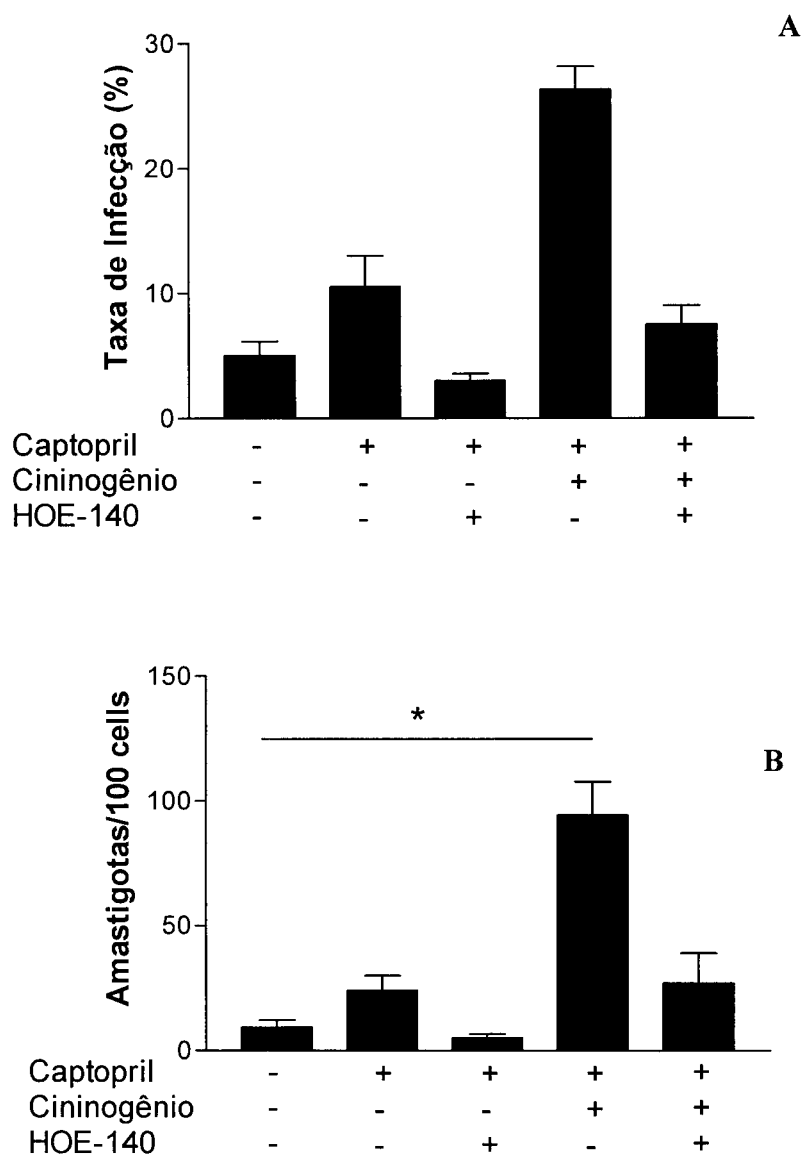


Figura 8. *Leishmanias* fagocitadas por macrófagos na presença de cininas, taxa de infecção (A) e número de parasitas intracelulares (B) 72 horas após a infecção. Macrófagos de baço de BALB/c foram infectados e avaliados por microscopia óptica 4 horas após as infecções. A cultura foi realizada sobre lamínulas de 13 mm de diâmetro por 72 horas. As culturas de células foram fixadas, coradas por hematoxilina e eosina e avaliadas por microscopia óptica. *= $p < 0.05$. $n = 3$

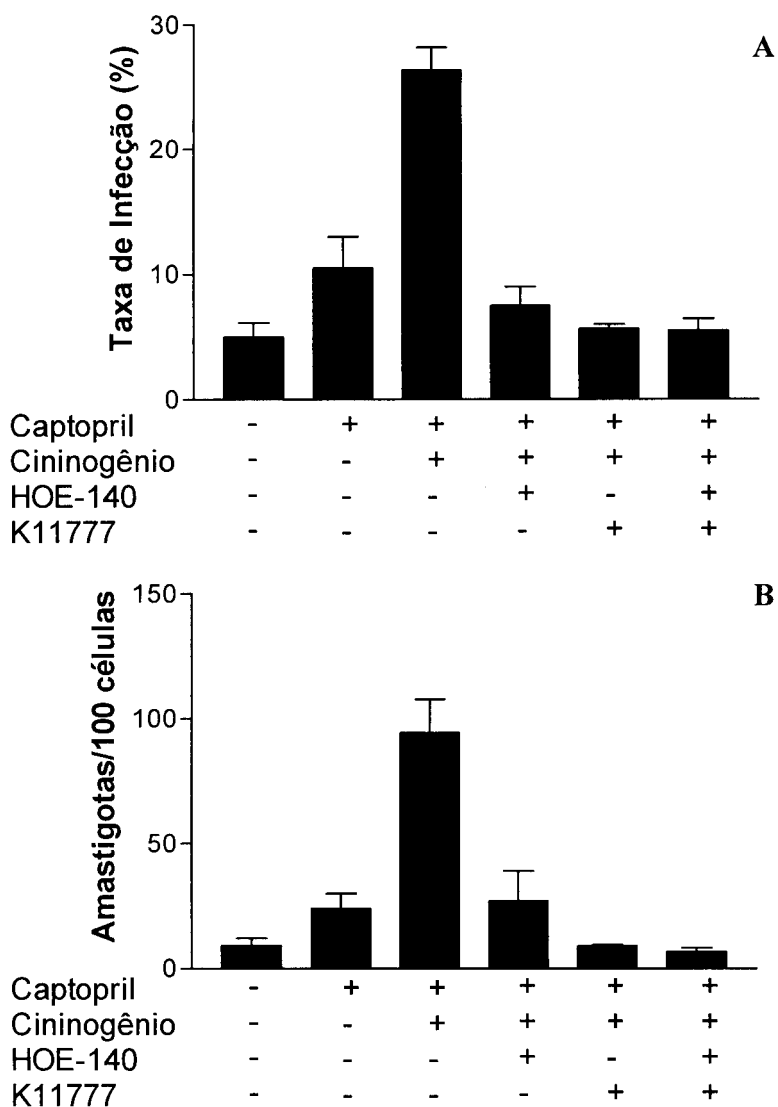


Figura 9. Pré-tratamento de *L. chagasi* com inibidor de cisteino protease. As *Leishmanias* foram pré-tratadas com K11777 (10 μ M), lavadas e utilizadas nos experimentos. Macrófagos de baço de BALB/c foram infectados por *L. chagasi* (10:1) e após 4 horas as culturas foram lavadas e incubadas por 72 horas, onde se avaliou também a taxa de infecção e o número de parasitas em cem macrófagos. A cultura foi realizada sobre lamínulas de 13 mm de diâmetro. **A.** Taxa de infecção de macrófagos de baço de BALB/c. **B.** Número de parasitas no interior de cem macrófagos contados. n=3

6.7. A Entrada de *Leishmanias* no Interior de Macrófagos Pode Ser Aumentada Pela Presença de Soro

Os cininogênios são glicoproteínas sintetizadas pelos hepatócitos e secretadas na corrente sanguínea. Assim, o soro pode ser considerado uma fonte a natural de cininogênios. Para avaliar se o aumento da entrada de *Leishmanias* também acontecia na presença de soro bovino fetal, experimentos foram realizados com macrófagos peritoneais murinos. Como mostrado nas **Figuras 10A, 10B, 11A e 11B** em presença de soro (10%) tanto as taxas de infecção como o número de parasitas no interior das células se mostrou ainda mais elevado.

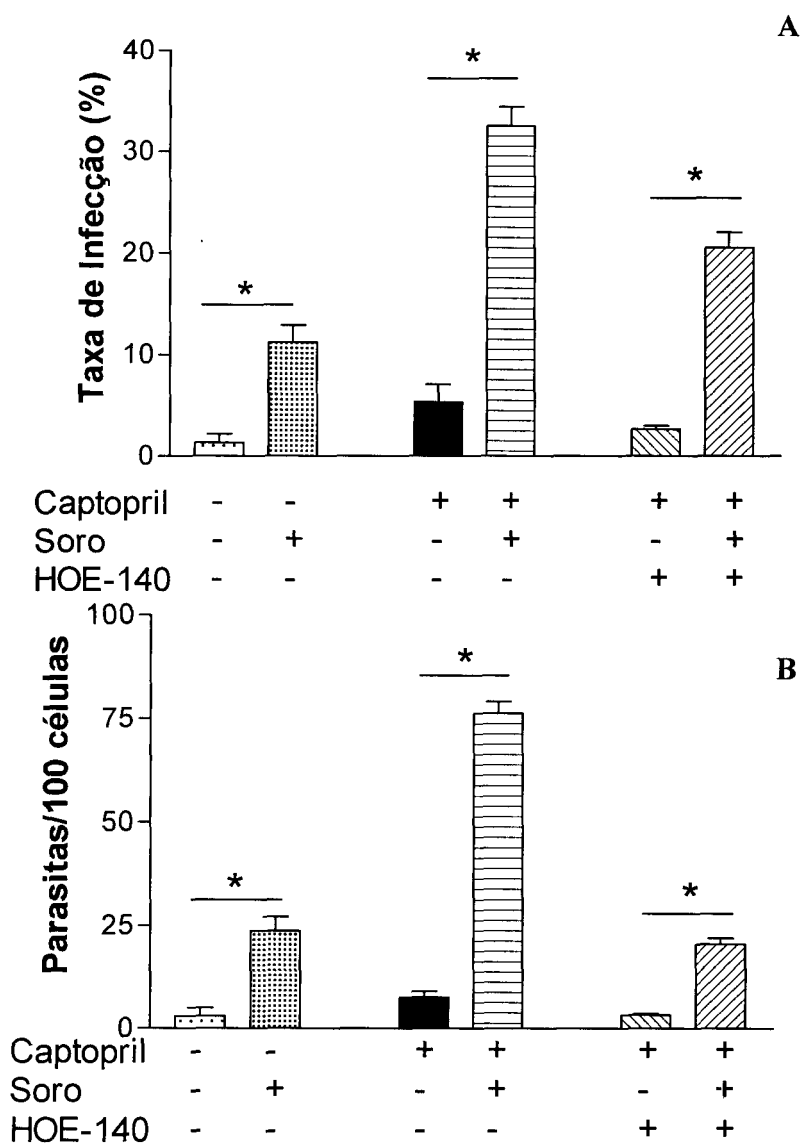


Figura 10. Efeito do soro na infecção de macrófagos por *L. chagasi*. Macrófagos murinos infectados, foram avaliados 4 horas após infecção que ocorreu em meio com ou sem a presença de soro bovino fetal em preparações coradas por H&E. Em algumas condições captopril (25 μ M) e/ou HOE-140 (100nM) foram adicionados às culturas. **A.** Taxa de infecção de macrófagos peritoneais de BALB/c. **B.** Número de amastigotas em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. Onde $*=p<0.05$. Testes t de Student. n=4

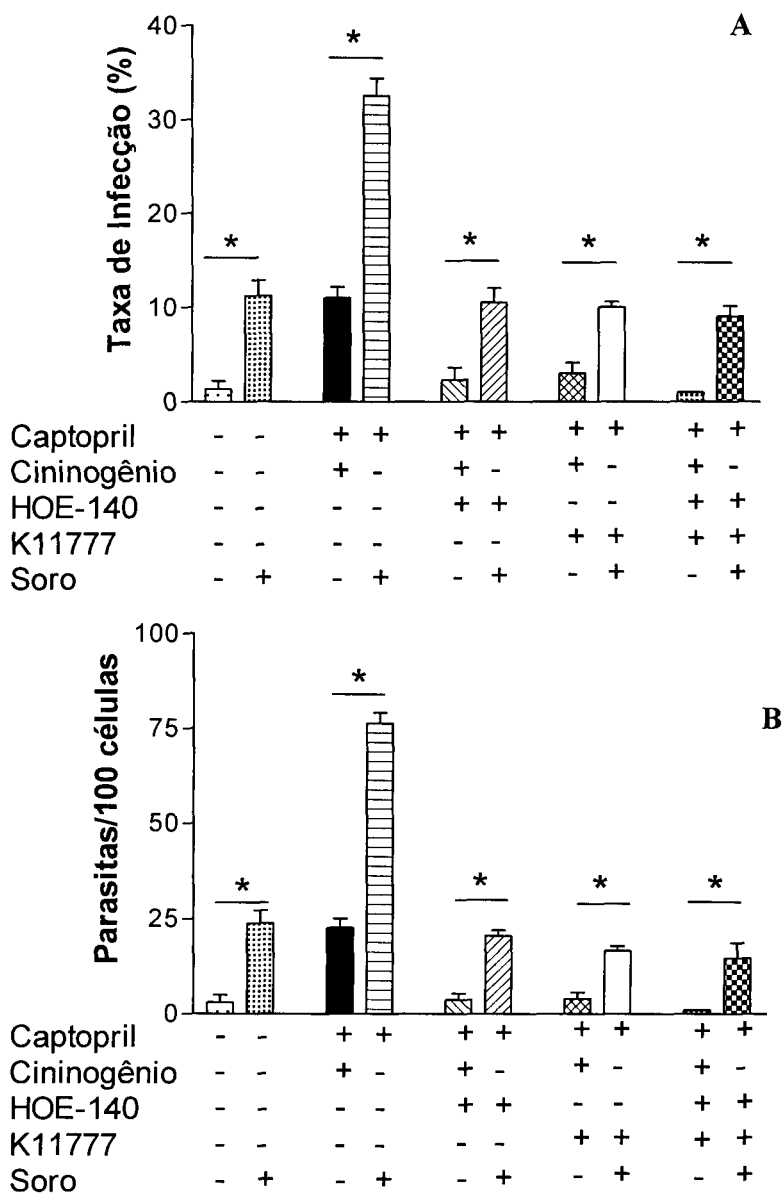


Figura 11. Efeito do soro na infecção de macrófagos por *L. chagasi*. Macrófagos murinos infectados foram avaliados 4 horas após infecção em meio com ou sem a presença de soro bovino fetal em preparações coradas por HE. Em algumas condições captopril (25 μ M) ou HOE-140 (100nM) foram adicionados às culturas. **A.** Taxa de infecção de macrófagos peritoneais de BALB/c. **B.** Número de amastigotas em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. Onde $*=p<0.05$. Testes t de Student. n=3

6.8. Avaliação da Produção de Citocinas em Sobrenadantes de Cultura de Macrófagos J774 Infectados por *L. chagasi*

Para se avaliar a produção de citocinas, devido à infecção por *L. chagasi* em um ambiente contendo cininas. Macrófagos J774 foram infectados por *L. chagasi* (5:1) na ausência de soro sendo avaliados quanto a produção de IL-10 e IL-12 quarenta e oito horas após a infecção. Como mostrado na **figura 13A** a simples suplementação do meio com captopril (25 μ M) pode levar a um aumento da produção de IL-10, enquanto que o fornecimento de bradicinina (10nM) ou cininogênio de alto peso molecular (30nM) promove a produção de desta citocina. Em todas as abordagens experimentais utilizadas observou-se que esta produção é revertida pela adição de HOE-10 (100nM). Por outro lado, a produção de IL-12p70 não detectou-se em nenhuma das condições testadas (dados não mostrados).

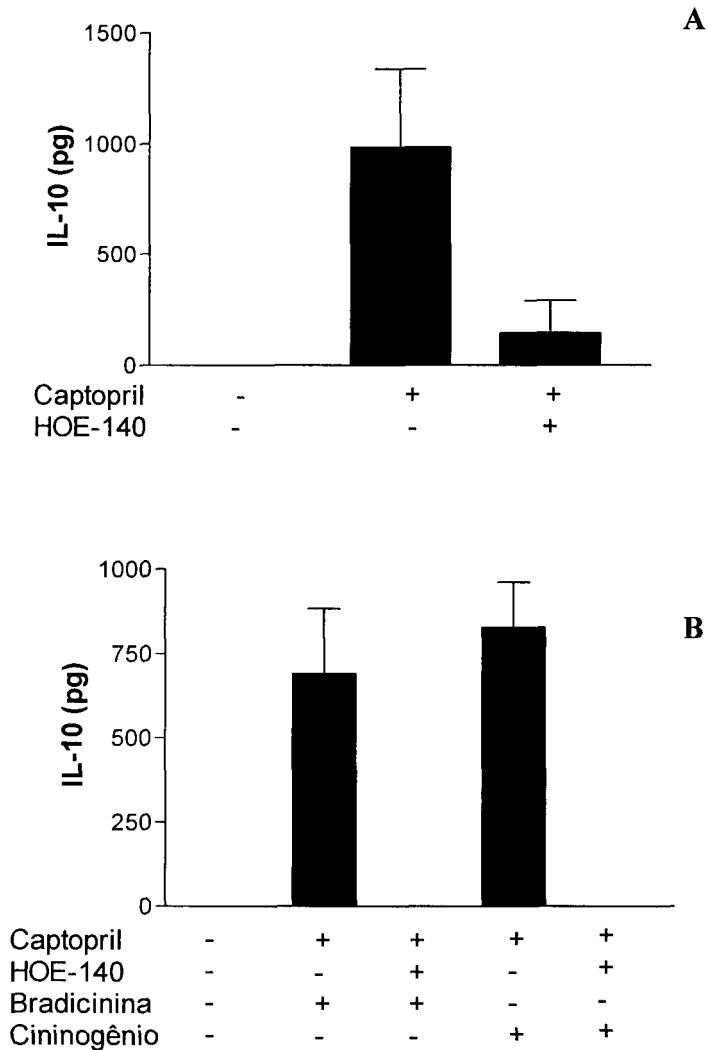


Figura 12. Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura de linhagem de macrófagos J774. Macrófagos murinos J774 foram infectados por *L. chagasi* na relação de 5 parasitas por macrófago por 4 horas, as culturas foram, então lavadas com salina e cultivadas em lamínulas de 13 mm por 48 horas. Os sobrenadantes das culturas foram avaliados por ELISA de acordo com as recomendações do fabricante. Em algumas condições os meios foram suplementados com captopril (25 μ M), HOE-140 (100nM), Bradicinina (10nM) e Cininogênio (30nM). n=3

7. DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a participação das cininas nos momentos iniciais da infecção por *L. chagasi*. Neste estudo demonstramos que a invasão de células do hospedeiro pode ser aumentada quando o sistema de cininas é acionado.

As cininas são potentes peptídeos vasoativos conhecidos por serem responsáveis pelos sinais cardinais da inflamação, e várias outras atividades biológicas (Bhoola *et al.*, 1992). As cininas possuem meia vida muito curta (cerca de 30 segundos na corrente sanguínea), sendo rapidamente degradadas por um amplo espectro de enzimas conhecidas como cininases, podendo estas ser do tipo I ou do tipo II (CASSIM & BHOOLA, 2002). Portanto, a presença de captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), uma cininase do tipo II, no meio de cultura foi um pré-requisito essencial para o aumento da meia vida das cininas geradas ou fornecidas nas situações experimentais, e assim, permitir a observação de seus efeitos na invasão de macrófagos *in vitro* por *L. chagasi*. Os efeitos induzidos pelo captopril sugerem que, o tropismo tecidual da *L. chagasi*, assim como para o *T. cruzi*, pode ser influenciado por níveis variáveis de peptídeos capazes de degradar cininas expressos em diferentes tecidos (SHARFSTEIN *et al.*, 2000).

A demonstração prévia de que alguns patógenos capazes de expressar cisteína proteases, como por exemplo, *Streptococcus pyogenes* e *Porphyromonas gingivalis*, eram capazes de liberar rapidamente bradicinina a partir de cininogênio humano (PAVLOFF *et al.*, 1995; HERWALD *et al.*, 1996) incetivou NERY *et al.*, (1997) a demonstrar que a principal cisteína protease de *T. cruzi*, a cruzipaina, possuía atividade de cininogenase. Além disso, estudos demonstraram que proteoglicanas, como o heparan sulfato e o sulfato

de condroitina, possuem sítios de alta afinidade de ligação ao cininogênio de alto peso molecular, sendo importantes para o acúmulo destas proteínas nas superfícies de células endoteliais (RENÉ *et al.*, 2000; RENÉ *et al.*, 2001). Assim, o reconhecimento do heparan sulfato como uma molécula para adesão inicial de *T. cruzi* a células do hospedeiro, conduziram o grupo de LIMA (2002), a mostrar que o heparan sulfato modula a liberação de cininas pelo *T. cruzi*, pela ação da cruzipaina.

Ao avaliarmos as taxas de infecção e o número de *Leishmanias* no interior de macrófagos, observamos que apenas a adição de captopril ao meio de cultura é suficiente para causar um aumento significativo dos índices de infecção investigados, mesmo quando os experimentos foram conduzidos sem soro bovino fetal, fonte natural de cininogênios. Mesmo após sucessivas lavagens, os cininogênios permanecem ligados ao glicocálix das células pelo heparan sulfato, e assim, disponibilizam estas moléculas aos parasitas nos primeiros momentos da interação com as células do hospedeiro.

Tanto o receptor B₁ como o B₂ da bradicinina são acoplados à proteína G (BHOOLA *et al.*, 1992), e como já está bem estabelecido, os receptores acoplados à proteína G constituem a principal família de receptores acoplados à superfície celular, mediando respostas celulares a uma grande variedade de moléculas sinalizadoras. Uma vez ativados, os receptores acoplados à proteína G podem levar a geração de moléculas sinalizadoras intracelulares, também conhecidas como segundos mensageiros. Assim, a partir da hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) é gerado o inositol trifosfato (IP₃) uma molécula hidrossolúvel que deixa a membrana plasmática e se difunde rapidamente através do citosol, onde, pela ligação com canais de cálcio presentes na membrana do retículo endoplasmático promove um rápido aumento das concentrações citoplasmáticas de Ca⁺⁺ (ALBERT *et al.*, 1999). Em nossos resultados, observamos que a simples adição de

bradicinina ao meio de cultura é capaz de aumentar os índices de infecção quatro horas após os experimentos de infecção das células. Alguns trabalhos na literatura relatam a importância do cálcio em processos de invasão de células por diferentes parasitas protozoários como *T. cruzi*, *Plasmodium falciparum* e *Leishmania donovani*. Está estabelecido que, aumentos transitórios das concentrações citoplasmáticas de cálcio podem ser requeridos para, no mínimo, dois passos importantes nos processos de entrada dos parasitas nas células: (1) rearranjo local do citoesqueleto cortical de actina permitindo o acesso de lisossomas à membrana plasmática e, (2) fusão dos lisossomas no sítio de entrada do parasita (MISRA *et al.*, 1991; TARDIEUX *et al.*, 1996; RUIZ *et al.*, 1998).

Além disso, a ativação dos receptores de bradicinina pode induzir a produção de prostaglandina E₂ via ciclooxigenase (BRADBURY *et al.*, 2004) e como mostrado em 1998 por Wu e colaboradores, esta prostaglandina pode inibir a expressão de receptor do IL-12 bem como a responsividade a esta citocina, o que pode ter um papel importante na visceralização da *Leishmania chagasi*. Além disso, foi demonstrado que a PGE₂ pode diminuir a produção de IFN- γ , TNF- α bem como aumentar a produção de IL-4 tornando camundongos BALB/c mais susceptíveis a infecção por *L. major* (MILANO *et al.*, 1996).

Ao avaliarmos a concentração de bradicinina que levava a um maior aumento do número de parasitas nos macrófagos observamos que a melhor concentração foi a de 10 nM, enquanto que, concentrações mais elevadas deste nonapeptídeo causaram novamente uma redução dos índices de infecção quatro horas após os ensaios de invasão. Estes fatos estão de acordo com dados que mostram que o receptor B₂ da bradicinina, que é constitutivamente expresso em muitos tipos celulares, pode ser fosforilado e internalizado quando estimulados por agonistas, ao contrário do que ocorre com o receptor B₁, que só é expresso em estados inflamatórios, é resistente a dessensibilização por não ser internalizado

pelas células que o expressam após o estímulo por agonistas (BLAUK *et al.*, 1999). Neste contexto, nossos resultados mostram que, a *L. chagasi* pode gerar a bradicinina durante o seu processo de interação com as células do hospedeiro. Mesmo quando os experimentos são conduzidos na ausência de soro, a simples adição de captopril aumenta os índices de infecção, enquanto que a suplementação do meio com o precursor imediato da bradicinina pode incrementar ainda mais este aumento, apontando para a possibilidade da *L. chagasi* possuir um arsenal enzimático com atividade de cininogenase, e que semelhante ao mostrado com a bradicinina, altas concentrações de cininogênio de alto peso molecular podem, também, levar à uma redução dos índices de infecção observados. Estes dados concordam com dados anteriormente publicados, mostrando comportamento semelhante para o *T. cruzi* (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000).

A utilização de antagonistas seletivos dos receptores de bradicinina tornou possível a confirmação que o aumento dos índices de infecção de macrófagos quatro horas após os experimentos de invasão é realmente devido à ativação desta subclasse de receptor, uma vez que, quando fornecido às condições experimentais, sua presença cancela o aumento das taxas de infecção das células avaliadas quatro horas após a infecção. Assim, como mostrado em relatos da literatura o uso do HOE-140 ou Icatibant é capaz de impedir a ativação dos receptores B2 da bradicinina (LANDGRAF *et al.*, 2003; ALIBERT *et al.*, 2003; KONDO & TOGARI, 2004). Entretanto, nossos resultados mostram claramente a existência de outras portas de entrada da *Leishmania* em macrófagos, uma vez que a utilização do HOE-140 não é capaz de inibir totalmente as taxas de infecção, fazendo-as apenas retornar aos níveis parecidos com os dos controles, e portanto, de acordo com relatos que mostram a possibilidade de entrada de *Leishmanias* nas células por outras vias,

como descrito por BRITTINGHAM e colaboradores (1995). Estes autores mostraram o envolvimento da gp63, uma glicoproteína de 63 KDa, na fagocitose de *Leishmania* por macrófagos, na adesão celular bem como na resistência à lise mediada por complemento. Outro trabalho recentemente publicado mostra que, embora os receptores de bradicinina sejam importantes para a entrada de *T. cruzi* em células do hospedeiro, existem portas de entrada nas células que são independentes da sinalização via receptor de bradicinina (APARÍCIO *et al.*, 2004). Contudo, a demonstração de que o aumento dos índices de infecção ocorre nos macrófagos de origens mais variadas, ou seja, oriundos do baço ou peritônio de hamsters ou camundongos BALB/c apontam para a importância desta via de sinalização nos momentos iniciais da infecção por *L. chagasi*.

Devido à ampla distribuição de cisteíno proteases nos mais variados parasitas (SAIID & MCKERROW, 2002), e pelo fato que essas enzimas desempenham diversas funções biológicas em protozoários (KLEMBA & GOLDENBERG, 2000) os seus papéis têm sido amplamente estudados. Além disso, observações prévias do grupo de SCHARFSTEIN (2003), nos incentivaram a utilizar inibidores sintéticos de cisteína proteases em *Leishmania chagasi*. Diversos relatos na literatura mostram que cisteíno proteases podem ser essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência de várias espécies de *Leishmania*. Estudos recentes mostram que *L. chagasi* e *L. donovani* possuem cisteíno proteases e que a expressão destas enzimas é altamente regulada, sendo de fundamental importância para a sobrevivência de formas amastigotas no interior de macrófagos (MUNDODI *et al.*, 2002; MUNDODI *et al.*, 2005). Dados semelhantes também foram publicados por Lakosvitsch e colaboradores em 2003 em relação à *L. amazonensis*. Em *L. mexicana* cisteíno proteases têm sido amplamente estudadas. Este parasito contém muitas cisteíno

proteases que são classificadas como membros da superfamília das papaínas, produzidas como precursores inativos que são processados para produzir enzimas maduras e ativas (BERT & STORER, 1995; BROOKS *et al.*, 2000). Assim, a partir da idéia de que cisteino proteases de *L. mexicana* poderiam ser importantes para o desenvolvimento de uma resposta Th2 devido à grande produção de IL-4 (FINKELMAN *et al.*, 1992), Alexander e colaboradores em 2003 verificaram que *L. mexicana* mutantes deficientes em cisteino proteases possuem virulência atenuada em camundongos bem como potencializam uma resposta do tipo Th1, uma vez que camundongos infectados com a cepa mutante desenvolvem lesões menores, quantidades aumentadas de IFN- γ e IL-2, e quantidades menores de IL-4 quando comparados à cepa selvagem. Além disso, camundongos BALB/c vacinados com cepas mutantes deficientes em cisteino protease quando desafiados com cepas selvagens de *L. mexicana* desenvolvem lesões menores que os animais não vacinados (ALEXANDER *et al.*, 2003).

De acordo com esses dados, POLOK e colaboradores (2003), verificaram que cisteino proteases de *L. mexicana*, CPB2.8, são capazes de induzir potentes respostas do tipo Th2, e que apenas a enzima ativa é capaz de induzir a produção de IgE, a vacinação com CPB2.8 resulta no aumento das lesões, mas quando os animais são vacinados com CPB2.8 mais IL-12 ocorre uma inibição do crescimento da lesão. Ainda neste contexto, DENISE e colaboradores (2003), mostraram que a expressão de múltiplos genes codificando cisteino proteases é requeridas para a virulência de *L. mexicana in vivo*, onde seus resultados revelam que a expressão desses múltiplos genes é a chave para o desenvolvimento de uma resposta Th2 e conseqüentemente para a virulência de *L. mexicana* em camundongos. Entretanto, foi mostrado que cisteino proteases de *L. mexicana*

(CPB) não possuem atividade de cininogenase, não podendo assim liberar bradiginina ou lisil-bradiginina a partir do cininogênio de alto peso molecular ou de baixo peso molecular, respectivamente (ALVES *et al.*, 2001). Nossos resultados mostram que o pré-tratamento da *Leishmania chagasi* com um inibidor irreversível de cisteína protease, o fenol de N-metilpiperazina-urea-Phe-homoPhe-vinilsulfona-benzeno, também conhecido como K11777, é capaz de prevenir o aumento dos índices de infecção observados na presença de cininogênio de alto peso molecular e mesmo com a adição de HOE-140 não é possível observar uma diminuição adicional das taxas de infecção bem como no número de parasitas no interior das células quatro horas após a infecção, apontando para a possibilidade de que mesmo por mecanismos diferentes, tanto o K11777 como o HOE-140 podem bloquear a entrada de *L. chagasi* em macrófagos via inibição da sinalização do receptor B2 da bradiginina.

Menores índices de infecção no caso culturas de macrófagos infectadas com *L. chagasi* pré-tratadas com K11777, estão de acordo com os dados observados por MAMOUDZADEH-NIKNAM & MCKERROW (2004), que mostraram que cisteína proteases são essenciais para o crescimento e patogenicidade de *L. tropica*. Além disso, observaram também que K11777 inibe a proliferação deste parasita em culturas de forma dose dependente, bem como causa a diminuição das lesões em BALB/c.

Um outro fator interessante é o fato de que quando realizados em presença de soro os experimentos apresentam maiores índices de infecção quando comparados com os experimentos realizados sem soro, provavelmente pela abundante opsonização das *Leishmanias* por complemento, facilitando a entrada destes parasitas nas células (DOMINGUEZ *et al.*, 2003).

Svensjö e colaboradores, 2005, mostraram que em culturas de células provenientes de lavado peritonial de BALB/c, que consiste em uma população rica em macrófagos é encontrada, a ativação do receptor de bradicinina que leva a morte das *Leishmanias* no interior dessas células, quando os experimentos são realizados na presença de soro. Ao mesmo tempo, a inibição da ativação do receptor B2 da bradicinina pode levar a um aumento da proliferação dos parasitas no interior das células macrofágicas. Entretanto, nossos experimentos, o acompanhamento de culturas de baço de BALB/c por tempos maiores, mostra que, nas condições onde temos a suplementação de cininogênio ao meio de cultura, ocorre uma proliferação das *Leishmanias* no interior dos macrófagos, avaliados por 72 horas após as infecções. Esta diferença pode ser explicada pela diferença de populações celulares encontradas nas culturas de células de baço, onde apenas 59% das células são CD11b+, marcador de macrófagos. Essas diferenças nas populações celulares poderiam acarretar em mecanismos de respostas diferentes.

Já se mostrou que a ativação dos receptores B₂ da bradicinina pode induzir células dendríticas a produzirem IL-12 e por isso ter uma provável aplicação como adjuvantes em vacinas objetivando-se uma resposta do tipo Th1 (ALIBERTI *et al.*, 2003). Entretanto, a interação dos parasitos com células do hospedeiro em um ambiente contendo cininas pode levar a uma desativação de células, como macrófagos, facilitando a proliferação parasitária. Esta linha de pensamento pode ser reforçada pela avaliação dos sobrenadantes de cultura de macrófagos murinos J774 infectados com *L. chagasi*, em presença de bradicinina ou cininogênio. Estes experimentos mostraram um aumento na produção de IL-10 e que esta produção pode ser inibida na presença de HOE-140. Por outro lado, a presença de IL-12 nestes sobrenadantes não foi detectada por ELISA. Como está bem estabelecido na

literatura, a IL-10, uma citocina anti-inflamatória que leva a desativação de macrófagos bem como outras células do sistema imune, tem importante papel na sobrevivência de patógenos intracelulares (GOMES *et al.*, 2000; GORDON, 2002; ALIBERT, 2005). Entretanto, vários relatos na literatura mostram que a IL-12, citocina produzida por macrófagos, é importante tanto para a ativação destas células mononucleares (McDAWELL *et al.*, 2002; GUMY *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005) como para a produção de IFN- γ por linfócitos contribuindo para o controle da infecção por patógenos intracelulares (McMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004; HUNTER *et al.*, 2004; MELBY *et al.*, 2001).

STEMPIN e colaboradores (2002), mostraram que a cruzipaina pode promover a sobrevivência de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos murinos através da produção de IL-10 e TGF- β por células J774 infectadas. Por outro lado, esta enzima é capaz de inibir tanto a produção de IL-12 pós-estímulo com LPS como a produção de óxido nítrico (STEMPIN *et al.*, 2002). Posteriormente, foi mostrado que amastigotas de *Leishmania mexicana* também são capazes de inibir a produção de IL-12 induzida por lipopolissacarídeo, no qual as cisteína proteases desse protozoário participam no processo de clivagem proteolítica de NF- κ B e I κ B impedindo a ativação transcricional das células e o desenvolvimento de uma resposta pró-inflamatória (CAMERON *et al.*, 2004).

Esta desativação de células macrofágicas por cisteínas proteases tem sido mostrada em vários trabalhos. Somanna e colaboradores mostraram em 2002 que cisteína proteases produzidas pelo complexo *Leishmania donovani* são capazes de clivar TGF- β presentes em uma forma latente em macrófagos, e assim, transformando-o numa forma ativa ou madura que auxilia os parasitas a superarem a atividade microbicida de macrófagos e assim garantir

sua sobrevivência no interior dessas células. A ativação do TGF- β foi posteriormente confirmada para *L. chagasi* mostrando que promastigotas desta espécie de *Leishmania* podem clivar o TGF- β latente e que este mecanismo de ativação pode ser inibida pelo uso de inibidores de cisteína próteses (GANTT *et al.*, 2003). Essas enzimas, portanto, possuem papéis importantes para a sobrevivência desses parasitas e que, com o aumento do conhecimento sobre suas funções biológicas seja possível, num futuro próximo, utilizar este complexo enzimático como alvo terapêutico.

8. CONCLUSÕES

- ❖ A *L. chagasi* possui enzimas com atividade de cininogenase, as quais são suprimidas por inibidores seletivos de cisteino proteases.
- ❖ A ativação do receptor B2 da bradicinina pode aumentar a infecção de macrófagos *in vitro*.
- ❖ Cisteino proteases podem aumentar a sobrevivência da *L. chagasi* em macrófagos de baço de BALB/c, as quais podem relacionar-se à produção de IL-10.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, J.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. **J. Immunol.** **161**: 6794-6801, 1998.

ALIBERTI, J.; VIOLA, J.P.B.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; BOZZA, P.T., SHER, A.; SCHARFSTEIN, J. Cutting edge: Bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: A danger signal that drives Th1 polarization. **J. Immunol.** **170**: 5349-5353, 2003.

ALVES, L.C.; JUDICE, W.A.S.; HILANE, P.M.S.; MEDAL, M.; SANDERSON, S.J.; MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H.; JULIANO, L.; JULIANO, M.A. substrate specificity of recombinant cysteine proteinase, CPB, of *Leishmania mexicana*. **Mol. Bioch. Parasitol.**, **116**: 1-9, 2001.

APARÍCIO, I. M.; SCHARFSTEIN, J., LIMA, APC. A new cruzipain-mediated pathway of h cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires tryposomastigote membranes. **Infect. Immun.** **72**: 5892-5902, 2004.

BARRAL, A.; HONDA, E.; CALDAS, A.; COSTA, J.; VINHAS, V.; ROWTON, E. D.; VALENZUELA, J. G.; CHARLAB, R.; BARRAL-NETO, M.; RIBEIRO, J. M. C.; 2000. Human response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? **Am. Soc. Trop. Med.**, **62**: 740-745, 2000.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M.; et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med . Hyg.** **44**: 536-46, 1991.

BASTOS, K.R.B.; MARINHO, C.R.F.; BARBOSA, R.; RUSSO, M., ÁLVAREZ, J.M.; LIMA, M.R.D. What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells?. **Microbes Infect.**, **6**: 630-636, 2004.

BELKAID, Y.; KAMHAWI, S.; MODI, G.; VALENZUELA, J.; NOBEN-TRUTH, N.; ROWTON, E.; RIBEIRO, J.; SACKS, D.; Development of a natural model of cutaneous Leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. **J. Exp. Méd.**, **188**: 1941-1953, 1998.

BHoola,K.D; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol. Rev.**, **44**: 1-80, 1992.

BLACKWELL, J; EZEKOWITZ, R.A.B.; ROBERTS, M.B.; CHANNON, J.Y.; SIM,R.B.; GORDON, S. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. **J. Exp. Med.** **162**:324-331, 1985.

BOSQUE, F.; MOUFQIA, J.; BELKAID, Y.; COLLE, J.H.; LECLERCQ, V.; LEBASTARD, M.; MILON, G. Parasite-host relationships: in-situ study of *Leishmania spp.* in resistant and susceptible mice. **Ann Trop.Med .Parasitol.**, **89**: 19-22, 1995. Suplemento1.

BRADBURY, D.A.; CORBETT, L.; KNOX, A.J. PI 3-kinase and MAP kinase regulate bradykinin induced prostaglandin E2 release in human pulmonary artery by modulating COX-2 activity. **FEBS Letters.** **560**: 30-34, 2004.

BROOKS, D.R.; TATLEY, L.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J.C. processing and trafficking of cysteine proteases in *Leishmania mexicana*. **J. Cell. Sci.**, **113**: 4035-4041, 2000.

CAMERON, P.; MCGACHY, A.; ANDERSON, M.; PAUL, A.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.; ALEXANDER, J.; PLEVIN, R. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF- κ B signaling pathway. **J. Immunol.** **173**: 3297-3304, 2004.

CASSIM, B.; MODY, G.; BHOOLA, D. K.; Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. **Pharmacol. Ther.**, **94**: 1-34, 2002

COSTA, D. J.; FAVALI, C.; CLARÊNCIO, J.; AFONSO, L.; CONCEIÇÃO, V.; MIRANDA, J.C.; TITUS, R.G.; VALENZUELA, J.; BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A.;

BRODSKYN, C.I.; *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. **Infect. Immun.**, **72**: 1298-1305, 2004.

COLON, J. M. Bradykinin and its receptors in non-mammalian vertebrates. **Regul. Peptides.**, **79**: 71-81, 1999.

COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. **Parasitol.**, **114**: S61-S80, 1997.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptative mechanisms en infection by *Leishmania*. **Exp. Mol. Pathol.**, **72**:132-141, 2002

DE ALMEIDA, M. C.; CARDOSO, S. A.; BARRAL-NETO, M. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of the adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. **Int. J. Parasitol.**, **33**: 153-162, 2003.

DE ALMEIDA, M. C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M. . Leishmanial infection: Analysis of first steps. A review. **Mem. Ins. Oswaldo Cruz** **98**: 861-870, 2003.

DENISE, H.; MCNAIL, K.; BROOKS, D. R.; ALEXANDER, J.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C.; Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. **Infect. Immun.**, **71**: 3195, 2003.

BRODSKYN, C.I.; *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. **Infect. Immun.**, **72**: 1298-1305, 2004.

COLON, J. M. Bradykinin and its receptors in non-mammalian vertebrates. **Regul. Peptides.**, **79**: 71-81, 1999.

COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. **Parasitol.**, **114**: S61-S80, 1997.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptative mechanisms en infection by *Leishmania*. **Exp. Mol. Pathol.**, **72**:132-141, 2002

DE ALMEIDA, M. C.; CARDOSO, S. A.; BARRAL-NETO, M. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of the adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. **Int. J. Parasitol.**, **33**: 153-162, 2003.

DE ALMEIDA, M. C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M. . Leishmanial infection: Analysis of first steps. A review. **Mem. Ins. Oswaldo Cruz** **98**: 861-870, 2003.

DENISE, H.; MCNAIL, K.; BROOKS, D. R.; ALEXANDER, J.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C.; Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. **Infect. Immun.**, **71**: 3195, 2003.

DOMINGUEZ, M; MORENO, I; AIZPURA, C.; TORAÑO, A. Early mechanisms of *Leishmania* infection. **Micr. Infect.**, **5-6**: 507-513, 2003.

EDLESTON, J.; CHRISTIANSEN, S.C.; JENKINS, G.R.; KOZIOL, J.A.; ZURAW, B.L. Bradykin increases the in vivo expression of the CXC chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in patients with allergic rhinitis. **J. Allergy Clin Immunol.**, **111**: 106-12, 2003.

ENGWERDA, C.R.; ATO, M.; KAYE, P.M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends Parasitol.** **20**: 524-30, 2004.

FENG, J.; LI, H.; ROSENKRANZ, E.R. Bradykinin protects the rabbit heart after cardioplegic ischemia via NO-dependent pathways. **Ann Thorac Surg.** **70**: 2119-2124, 2000.

FRAME, M.; MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H. Analysis of the roles of cysteine proteinases in the host-parasite interaction. **Parasitology.**, **121**: 367-377, 2000.

GANTT, K.R.; GOLDMAN, T.L.; MCCORMICK, M.L.; MILLER, M.A.; JERONIMO, S.M.B.; NASCIMENTO, E.T.; BRITIGAN, B.E.; WILSON, M.E. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **J. Immunol.** **167**: 893-901, 2001.

GANTT, K.R.; SCULTZ-CHERRY, S.; RODRIGUEZ, N.; JERONIMO, S.M.B.; NASCIMENTO, E.W.; GOLDMAN, T.L.; RECKER, T.J.; MILLER, M.A.; WILSON,

M.E. Activation of TGF- β by *Leishmania chagasi*: Importance for parasite survival in macrophages. **J. Immunol.** **170**: 2613-2620, 2003.

GOMES, R.B.; BRODSKY, C.; OLIVEIRA, C.I.; COSTA, J.; MIRANDA, J.C.; CALDAS, A.; VALENZUELA, J.G.; BARRAL-NETA, M.; BARRAL, A. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. **J. Infect. Dis.**, **186**: 1530-4, 2002.

GRIMALDI, J.G.; TRESH, R.B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** **41**:687-725, 1996.

HANDMAN, E. AND GODING J.W. 1985. The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. **EMBO J.** **4**:329-336.

HERWALD, H.; COLLIN, M.; MULLER-ESTERL, W.; BJORK, L. 1996. Streptococcal cysteine proteases releases kinins: a virulence mechanism. **J. Exp. Med.** **184** : 665-73, 1996.

HSU, Y.; CHIU, C.; WANG, C.; CHIEN, C.; LUO, S.; HSIAO, L.; LIANG, K.; YANG, C. Tumor necrosis factor- α enhances bradykinin-induced signal transduction via activation of Rsa/Raf/MEK/MAPK in canine tracheal smooth muscle cells. **Cellular Signaling.**, **13**: 633-643, 2001.

HUNTER, C.A.; VILLARINO, A.; ARTIS,D.; SCOTT, P. The role of IL-27 in the development of T-cell responses during parasitic infections. **Immunol. Rev.**, 106-114: 2002.

KLEMBA, M.; GOLDBERG, D.E.; Biologicals roles of proteases in parasitic protozoa. **Annu. Rev. Biochem.**, 71: 275-305., 2002.

KONDO, A.; TOGARI, A. Activation of osteoblastic functions by a mediator of pain, bradykinin. **Biochem. Pharmacol.** 2004.

KOUYOUMDJIAN, M.; NAGAOKA, M.R.; BORGES, D.R. Kallikrein-kinin system in hepatic experimental models. **Peptides.** 2005.

LANDGRAF, R.G.; SIROIS, P.; JANCAR, S. Differential modulation of murine lung inflammation by bradykinin B₁ and B₂ receptor antagonists. **Eur. J. Pharmacol.** 460: 75-83, 2003.

LASAKOSVITSCH, F.; GENTIL, L. G.; dos SANTOS, M. R.; da SILVA, M. R.; da SILVEIRA, J. F.; BARBIERE, C. L. Cloning and characterization of cysteine proteases gene expressed in amastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis*. **Int. J. Parasitol.** 33: 445-454, 2003.

LENZI, H.L.; OLIVEIRA, D.N.; LIMA, M.; GATTASS, C.R. *Trypanosoma cruzi*: Paninfectivity of CL strain during murine acute infection. **Exp. Parasitol.**, 84: 16-25, 1996.

LIMA, A.P.C.; ALMEIDA, P.C.; TERSARIOL, I.L.S.; SHIMITZ, V.; SCHMAIES, A.H.; JULIANO, L.; HIRATA, I.Y.; MULLER-ESTERL, W.; CHAGAS, J.R.; SCHARFSTEIN, J. Heparan Sulfate modulates kinin release by *Trypanosoma cruzi* through the activity of cruzipain. **J. Biol. Chem.** **271**: 5875-5881.

LINDOSO, J.A.L.; COTRIM, P.C.; GOTO, H. Apoptosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigotes in hamsters infected with visceral leishmaniasis. **Internat. J. Parasitol.**, **34**: 1-4, 2004.

MAEDA, H.; AKAIKE, T.; WU, J.; NOGUCHI, Y.; SAKATA, Y. Bradykinin and nitric oxide in infectious disease and cancer. **Immunopharmacology**. **33**: 222-230, 1996.

MAHMOUDZADEH-NIKNAM, H.; MCKERROW, J.H. *Leishmania mexicana*: cysteine protease are essential for growth and pathogenicity. **Exp. Parasitol.** **106**: 158-163, 2004.

MARCEAU, F.; REGOLI, D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. **Nat. Rev.**, **3**: 845-852, 2004.

MARCEAU, F.; SABOURIM, T.; HOULE, S.; FORTIN, J.P.; PETITCLERC, E.; MOLINARO, G.; ADAM, A. Kinin receptor: functional aspects. **Int. Immunopharmacol.**, **2**: 1729-39, 2002.

MANTOVANI, A., SOZZANI, S., LOCATI, M., ALLAVERA, P., SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends. Immunol.** 23, 549-555, 2002.

MCKERROW, J.H.; MCGRATH, M.E.; ENGEL, J.C. The cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* as a model for antiparasite drug design. **Parasitol. Today.** 11: 8.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease?. **Immunol. Rev.** 201: 206-224, 2004.

MELBY, P.C.; CHANDRASEKAR, B.; ZHAO, W.; COE, J.E. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: Progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. **J. Immunol.** 166: 1912-1920, 2001.

MOREAU, M.E.; GARBACKI, N.; MOLINARO, G.; BROWN, N.J.; MACEAU, F.; ADAM, A. The kallikrein system: current and future pharmacological targets. **J. Pharmacol. Sci.** 99: 6-38. 2005.

MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Curr. Opin. Microbiol.** 7: 375-381, 2004.

MOTTRAM, J.C.; HELMS, M.J.; COOMBS, G.H.; SAJID, M. Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. **Trends Parasitol.**, 19: 4, 1993.

MUNDODI, V.; KUCHNOOR, A.; GEDAMU, L. Role of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition. **Mol. Biol.**, **6: 3**, 2005.

MUNDODI, V.; SOMANNA, A.; FARRELL, P.J.; GEDAMU, L. Genomic organization and functional expression of differentially regulated cysteine protease genes of *Leishmania donovani* complex. **Gene**. **282**: 257-65, 2002.

NERY, E.D.; JULIANO, M.A.; LIMA, A.P.C.; SCHARFSTEIN, J.; LULIANO, L. kininogenase activity by the major cysteinil protease (cruzipain) for *Trypanosoma cruzi* . **J. Biol. Chem.**, **272**: 25713-25718, 1997.

NEWTON, R.; EDDLESTON, J.; HADDAD, E.; HAWISA, S.; MAK, J.; LIM, S.; FOX, A.J.; DONNELLY, L.E.; CHUNG, F. Regulation of kinin receptors in airway apitelial cells by infalamatory cytokines and dexametasone. **Eur. J. Pharmacol.**, **441**: 193-202, 2002.

NIEVES, E.; PIMENTA, P.F. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). **J Med Entomol.**, **37**:134-40, 2000.

PAL-GHOSH, R.; Y.U. J.; PRADO, G. N.; TAYLOR, L.; MIERKE, P. P.; Chimeric exchanges with the bradykinin B2 receptor intracellular face with the prostaglandin EP2 receptor as the donor: importance of the second intracellular loop for cAMP synthesis.

PAVLOFF, N.; PEMBERTON, P.A.; POTEPA, J.; CHEN, W.C.; PIKE, R.N.; PROCHAZKA, V.; KIEFER, M.C.; TRAVES, J.; BARR, P.J. Molecular cloning and characterization of *Porphyromonas gingivalis* lysine-specific gingipain. A new member of an emerging family of pathogenic bacterial cysteine proteases. **J. Biol. Chem.** **27**: 1595-600, 1995.

PINHEIRO, P.H.C.; DIAS, S.S.; EULÁLIO, K.D.; MENDONÇA, I.L; KATZ, S.; BARBIÉRI, C.L. Recombinant Cysteine Proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* implicated in human and dog T- cell responses. **Infect. Immun.**, **73**: 3787-3789, 2005.

POLLOCK, K.G.J.; MCNEIL, K.S.; MOTTRAM, J.C.; LYONS, R.E.; BREWER, J.M.; SCOTT, P.; COOMBS, G.H., ALEXANDER, J. The *Leishmania mexicana* cysteine protease, CPB2.8, induces potent Th2 responses. **J. Immunol.**, **170**: 1746-1753, 2003.

QUITTERER, U.; SCHROEDER, C.; MULLER-ESTERL, W.; REHM, H. Effects of bradykinin and endothelin-I on the calcium homeostasis of mammalian cells. **J. Biol. Chem.** **270**: 1992-1999, 1995.

RENNE, T.; SCHUH, K.; MULLER-ESTERL, W. 2005. Local bradykinin formation is controlled by glycosaminoglycans. **J Immunol.**, **175**: 3377-85, 2005.

RIBEIRO, J. M. C.; Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Ann. Rev. Entomol.** **32**: 463-478, 1987.

ROGERS, K. A.; DEKREY, G. K.; MBOW, M. L.; GILLESPIE, R.D.; BRODSKYN, C. I.; TITUS, R. G.; Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiol. Letters.**, **209**: 1-7, 2002.

ROSENTAL, P.J. Proteases of protozoan parasites. **Adv. Parasitol.**, **43**: 105-159, 1999.

RUIZ, R.C.; FAVORETO, S.; DORTA, M.L.; OSHIRO, M.E.M.; FERREIRA, A.T.; MANQUE, P.M.; YOSHIDA, N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca⁺⁺ signaling activity. **Biochem. J.** **330**: 505-511, 1998.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev.**, **2**: 45-58, 2002.

SANDESON, S.J.; WESTROP, G.D.; SCHARFSTEIN, J.; MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H. Functional conservation of a natural cysteine peptidase inhibitor in protozoa and bacterial pathogens. **FEBS Lett.** **542**: 12-16, 2003.

SAJID, M.; MCKERROW, J.H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Mol. Biochem. Parasitol.** **120**: 1-21, 2002.

SCHARFSTEIN, J. Activation of bradykinin-receptors by *Trypanosona cruzi*: a role for cruzipain in microvascular pathology. In: J.M. Kelly. Molecular pathogenesis of Chagas' disease. Austin: Landes Bioscience, 2003. p.111-137.

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, M. M. A.; LIMA, A. P. C. A.; MORROT, A.; JULIANO, L.; MULLER-ESTER, W.; Host cell invasion by *Tripanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B2 receptors. **J. Exp. Med.**, **192**: 1289-1299, 2002.

SHIGENATSU, S.; ISHIDA, S.; GUTE, D.C.; KORTHUIS, R.J.; Bradykinin-induced proinflammatory signaling mechanisms. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, **283**: H2676-H2686.

SHIGENATSU, S.; ISHIDA, S.; GUTE, D.C.; KORTHUIS, R.J. Concentration-dependent effects of bradykinin on leukocyte recruitment and venular hemodynamics in rat mesentery. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, **277**: 152-160.

SOMANNA, A.; MUNDODI, V.; GEDAMU, L. Funcional analisis of cathepsin B like cysteine protease from *Leishmania donovani* complex: evidence for the activation of latente transforming growth factor β . **J. Biol. Chem.** **277**: 25305, 2002.

STEBUT, E. v.; BELKAIDE, Y.; JACOB, T.; SACKS, D.; UDEY, M.C. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. **J. Exp. Med.** **188**: 1547-1552, 1998.

STEBUT, E. v.; BELKAIDE, Y.; NGUYEN, B.V.; CUSHING, M.; SACKS, D.; UDEY, M.C. 2000. Antigen-pulsed epidermal Langerhans cells protect susceptible mice from infection with intracellular parasite *Leishmania major*. **Eur. J. Immunol.** **28**: 3800-3811.

STEBUT, E. v.; UDEY, M.C. Requirements for Th1 dependent immunity against infection with *Leishmania major*. **Microbes Infect.**, **6**: 1102-11109, 2004.

STEMPIN, C.; GLODARNENGO, L.; GEA, S.; CERBÁN, F. Alternative activation and Increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. **J. Leuc. Biol.** **72**: 727-734, 2002.

TITUS, R. G. AND RIBEIRO, J. M. C. Gland salivary lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance infectivity. **Science** **239**: 1306-1308, 1988.

TODOROV, A.G.; ANDRADE, D.; PESQUERO, J. B.; ARAÚJO, R.C.; BADER, M.; STEWART, J.; GERA, L.; MÜLLER-ESTERL, W.; MORANDI, V.; GOLDENBERG, R.C.S.; NETO, H.C.; SCHARFSTEIN, J. *Trypanosoma cruzi* induces cardiomyocytes and endothelial cells in vivo by activating distinct kinin receptor (B1/B2) subtypes. **FESEB J.** **17**: 73.

WEBB, J.G.; SHEARER, T.W.; YATES, P.W.; MUKHIN, Y.V.; CROSSON, C.E.
Bradykinin enhancement of PGE2 signalling in bovine trabecular meshwork cells.
Experimental Eye Research. 76: 283-289.

ZADEH-VAKILI, A.; TAHERI, T.; TASLIMI, Y.; DOUSTDARI, F.; SALMANIAN, A.;
RAFATI, S. Immunization with the hybrid protein vaccine, consisting of *Leishmania*
major cysteine proteinases type I (CPB) and type II (CPA), partially protects against
leishmaniasis. **Vaccine. 22:** 1930-1940, 2004.

ZER, R.; ISABELA, Y.; ROSEN, L.; WARBURG, A. Effect of sand fly saliva on
Leishmania uptake by murine macrophages. **Int. J. Parasitol. 31:** 810-814. 2001.

10. Anexo- Artigo

“Interplay between parasite cysteine proteases and the host kinin system modulates microvascular leakage and macrophage infection by promastigotes of the *Leishmania donovani* complex.”



Original article

Interplay between parasite cysteine proteases and the host kinin system modulates microvascular leakage and macrophage infection by promastigotes of the *Leishmania donovani* complex

Erik Svensjö^a, Paulo R. Batista^a, Claudia I. Brodskyn^b, Robson Silva^b, Ana Paula C.A. Lima^a, Verônica Schmitz^a, Elvira Saraiva^c, João B. Pesquero^d, Marcelo A.S. Mori^d, Werner Müller-Esterl^e, Julio Scharfstein^{a,*}

^a Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, C.C.S., Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, 21949-900 RJ, Brazil

^b Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, LIP, R. Valdemar Falcão, 121, Salvador, Bahia 40295-001, Brazil

^c Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, C.C.S., Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, 21949-900 RJ, Brazil

^d Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Estado de São Paulo (UNIFESP) Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brazil

^e Institute for Biochemistry II, University of Frankfurt Medical School, Frankfurt, Germany

Received 11 February 2005; accepted 16 June 2005

Available online 08 September 2005

Abstract

Kinins, the vasoactive peptides proteolytically liberated from kininogens, were recently recognized as signals alerting the innate immune system. Here we demonstrate that *Leishmania donovani* and *Leishmania chagasi*, two etiological agents of visceral leishmaniasis (VL), activate the kinin system. Intravital microscopy in the hamster cheek pouch showed that topically applied promastigotes induced macromolecular leakage (FITC-dextran) through postcapillary venules. Peaking at 15 min, the parasite-induced leakage was drastically enhanced by captopril (Cap), an inhibitor of angiotensin-converting enzyme (ACE), a kinin-degrading metallopeptidase. The enhanced microvascular responses were cancelled by HOE-140, an antagonist of the B₂ bradykinin receptor (B₂R), or by pre-treatment of promastigotes with the irreversible cysteine proteinase inhibitor *N*-methylpiperazine-urea-Phe-homoPhe-vinylsulfone-benzene (N-Pip-hF-VSPh). In agreement with the above-mentioned data, the promastigotes vigorously induced edema in the paw of Cap-treated J129 mice, but not Cap-B₂R^{-/-} mice. Analysis of parasite-induced breakdown of high molecular weight kininogens (HK), combined with active site-affinity-labeling with biotin-N-Pip-hF-VSPh, identified 35–40 kDa proteins as kinin-releasing cysteine peptidases. We then checked if macrophage infectivity was influenced by interplay between these kinin-releasing parasite proteases, kininogens, and kinin-degrading peptidases (i.e. ACE). Our studies revealed that full-fledged B₂R engagement resulted in vigorous increase of *L. chagasi* uptake by resident macrophages. Evidence that inflammatory macrophages treated with HOE-140 became highly susceptible to amastigote outgrowth, assessed 72 h after initial macrophage interaction, further suggests that the kinin/B₂R activation pathway may critically modulate inflammation and innate immunity in visceral leishmaniasis.

© 2005 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Leishmaniasis; Innate immunity; Inflammation; Macrophages; Endothelium; Kinins; Angiotensin-converting enzyme; Cysteine proteases

Abbreviations: ACE, angiotensin-converting enzyme; BK, bradykinin; BSA, bovine serum albumin; Cap, captopril; CBZ-Phe-Arg-MCA, carbobenzoxy-phenylalanyl-arginyl-7-amido-4-methylcoumarin; CP, cysteine proteinases; DTT, dithiothreitol; E-64, *L-trans*-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidino)butane; HCP, hamster cheek pouch; HK, high molecular weight kininogen; N-Pip-F-hF-VSPh or K11777, *N*-methylpiperazine-Phe-homoPhe-vinylsulfone-benzene; pHMG, promastigotes homogenates; TK, tissue kallikrein; VL, visceral leishmaniasis I. Introduction.

* Corresponding author. Tel.: +55 21 2209 6591; fax: +55 21 2280 8193.

E-mail address: scharf@biof.ufrj.br (J. Scharfstein).

1. Introduction

Transmitted by sandflies, the parasitic protozoa of the genus *Leishmania* are the etiological agents of cutaneous, mucocutaneous or visceral diseases in humans. Differences in *Leishmaniasis* species and host genetic composition underlie the diverse clinical manifestations of Leishmaniasis.

The life cycle of all *Leishmania* species involves two morphological forms—the amastigotes and the promastigotes. Mammalian infection is initiated when the sand-flies regurgitate following blood feeding, releasing metacyclic promastigotes in superficial layers of the dermis. At this time, the mechanical action of the sand fly proboscis provokes lacerations of blood capillaries in the host. Hemorrhages are intensified by the combined action of multiple anti-hemostatic factors and vasodilating substances present in the sand fly saliva [1]. Within minutes, the promastigotes are phagocytosed by macrophages, the internalization process being facilitated by complement receptor-mediated recognition of surface-bound C3b and/or C3bi opsonins [1–4]. After reaching the phagolysosomes, the promastigotes transform into amastigotes, the parasite replicating stages. Upon macrophage cell death, large numbers of infective amastigotes are released to the extracellular spaces. Recent studies in humans and mice suggest that innate immunity and pathological outcome in *Leishmania* infection is influenced by host responses to the sand fly vector. For instance, salivary products of *Phlebotomus papatasi* saliva products may induce IL-4 and IL-5, i.e. cytokines that down-modulate immune responses to *Leishmania major* [5]. Another study in patients infected with *Leishmania chagasi* showed that individuals that undergo seroconversion to sand fly saliva antigens are more prone to develop efficient cellular immune responses (delayed type hypersensitivity; DTH) against the parasite [6]. The complexity of the host–vector–parasite interplay is highlighted by the finding that increased blood flow in individuals that mount DTH responses to sand fly saliva antigens improves blood feeding by *P. papatasi* [7].

Visceral leishmaniasis (VL), also known as Kalazar, is caused by *Leishmania (Leishmania) donovani* in the Old World, by *L. (L.) infantum* in the Southeast of Europe and Mediterranean area and by *L. (L.) chagasi* in the New World. Dogs are a common animal reservoir of the *Leishmania* species that cause visceral leishmaniasis. The incubation period of visceral leishmaniasis ranges from 2 to 4 months. The disease may present an acute, subacute or chronic evolution, but most infected individuals remain completely asymptomatic (reviewed in [8]). The classical manifestations of VL are fever, cough, weight loss, weakness, diarrhea or dysentery and abdominal swelling. Patients also present anemia, edema, bleeding episodes, impaired cellular immunity and severe hepatosplenomegaly [8]. The determinants of visceralization in infected humans are not well understood. Studies in mice revealed that visceralization starts with a self-limiting infection in the liver, usually controlled at expense of moderate TNF- α production [9]. After involving the spleen, the infec-

tion in mice becomes persistent, causing a life-long splenomegaly associated with exacerbated TNF- α production [9]. Immunohistochemical studies performed with high dose of intravenously injected amastigotes showed that the parasites are initially cleared from the circulation by the heterogeneous macrophage sub-populations present in the spleen marginal zone [10]. Low dose infection models involving intradermal inoculation of *L. donovani* promastigotes into susceptible mice [11] indicated that parasite clearance from skin and liver may depend on infiltration and activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells while the persisting infection in the spleen and draining lymph node correlates with enhanced production of Th1/Th2 cytokines (interleukin-4 [IL-4], IL-10, and gamma interferon) [11].

Here we studied the involvement of the kinin system in inflammatory responses evoked by *L. donovani* and *L. chagasi*. Structurally related to the nonapeptide bradykinin (BK), the term “kinins” is a general designation for the group of potent vasoactive peptides liberated from an internal segment of their plasma protein precursors, high and/or low-molecular weight kininogens (HK/LK) [12]. Although classically associated with acute inflammatory responses (e.g. increased blood flow, edema formation, vasodilatation and pain sensations), BK or for that matter, lysyl-BK, were recently identified as potent stimulators of dendritic cell maturation, an effect coupled to IL-12-driven polarization of Th1-type responses [13]. Tissue injury caused by physical trauma or noxious substances can lead to BK or Lysyl-BK excision from HK/LK by the respective action of the serine proteases, plasma and tissue kallikrein [12]. In inflammatory conditions, oxidized forms of kininogens may be cleaved by the concerted action of neutrophil elastase and mast cell tryptase, liberating Met-Lys-bradykinin [14]. Once liberated, kinins act in a paracrine mode, activating a broad range of host cell types (e.g. endothelial cells, epithelial cells, neurons and dendritic cells) through the constitutively expressed B₂ bradykinin receptor [13,15]. Alternatively, they undergo further processing by carboxypeptidases M/N, generating [des-Arg]-kinins, which are agonists for the B₁ kinin receptor, upregulated during inflammation [16]. The duration of the effects of kinins on their G-protein coupled receptors is normally limited by the degradative action of several metallopeptidases, particularly, angiotensin-converting enzyme (ACE, also known as kininase II), a di-peptidylpeptidase expressed at high levels on the vascular endothelium.

Activation of the kinin pathway has been implicated in the dissemination of several bacterial pathogens [17,18]. Inflammation induced by *Porphyromonas gingivalis*, the etiological agent of periodontitis, is partly driven by the kinin-releasing activity of a cysteine protease, gingipain [19,20]. Another example of a pathogen that relies on a cysteine protease to liberate kinins from kininogens came from our own investigations [21–24] on the cellular activation pathways underlying inflammation and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*, the intracellular parasitic protozoan that causes Chagas' disease. Here we report results from studies in two

animal models, hamster cheek pouch and mouse paw, demonstrating that *L. donovani* or *L. chagasi* promastigotes share with *T. cruzi* the ability to activate the kinin system. Further, we will present data linking regulation of the kinin system to pathways that modulate inflammation and macrophage susceptibility to infection by *L. donovani* and *L. chagasi* promastigotes.

2. Materials and methods

2.1. Parasites

L. chagasi promastigotes (MHOM/BR00/MER/Strain2) were cultivated in Schneider's insect Medium (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) supplemented with 20% inactivated FCS, L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) at 23 °C for 5–7 days when the parasites reached the stationary-phase. The parasites used in macrophage infection assays were washed 3× times with saline at 2500 rpm for 10 min, resuspended in RPMI medium and adjusted to 5×10^7 – 10^8 per ml. *L. donovani* Sudan (LD 1S/MHOM/SD/00-strain 1S) was cultured in BHI medium containing 10% FCS (GIBCO BRL, Tulsa, OK). *L. chagasi* metacyclics were prepared from 5 days stationary-phase cultures using a density-gradient method [25]. Briefly, promastigotes were washed and resuspended in Hanks, then layered on a two-step Ficoll gradient (2 ml of 5% and 4 ml of 10%) and centrifuged at $1300 \times g$ for 10 min at room temperature. Based on morphological criteria, the *L. chagasi* promastigotes recovered from the second 10% step had 70–90% of metacyclics. 40% of this *L. chagasi* population corresponds to the subset of metacyclics that is resistant to complement-mediated lysis (25% fresh human serum) while log-phase *L. chagasi* promastigotes are 100% lysed under these conditions. Assays with *L. donovani* promastigotes were performed with promastigotes isolated from 7-day-old stationary-phase cultures, after adjusting the cell suspension to 5×10^7 – 10^8 per ml in phosphate buffered saline. Cellular homogenates obtained from *L. donovani* promastigotes (pHMG) were obtained by subjecting the parasite suspension to four to five freezing–thawing cycles followed by centrifugation at $1300 \times g$ for 10 min in PBS before being used in the studies described below.

2.2. Intravital microscopy of the hamster cheek pouch

Hamsters were anesthetized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital supplemented with i.v. α -chloralose (2.5% W/V, solution in saline) through a femoral vein catheter. A tracheal cannula (PE 190) was inserted to facilitate spontaneous breathing and the body temperature was maintained at 37 °C by a heating pad monitored with a rectal thermometer. The hamster cheek pouch (HCP) was prepared and used for intravital microscopy as previously reported [26,27]. Briefly, the cheek pouch was everted and mounted on a micro-

scope stage and an area of about 1 cm² was prepared for intravital microscopy observations of the microcirculation. Thirty min after the preparation was completed, fluorescein-labeled dextran (FITC-dextran, MW = 150 kDa; 250 mg/Kg body weight) was injected intravenously as a macromolecular tracer. The cheek pouch was continuously superfused with a HEPES-bicarbonate-buffered saline solution pH 7.4 (composition in mM: 110.0 NaCl, 4.7 KCl, 2.0 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 18.0 NaHCO₃, 15.39 HEPES and 14.61 Na HEPES) at a constant rate of 6 ml/min. The superfusion solution was continuously bubbled with a 5% CO₂ and 95% N₂-mixture to maintain a low and physiological level of oxygen around the cheek pouch. A heater device was adjusted to maintain a temperature of 35 °C of the superfusion solution. The microvascular permeability increase for large molecules (plasma leakage) was quantified by counting sites with extravasation of fluorescent plasma (leaky sites = leaks) at postcapillary venules at 2–5 min intervals after topical application of *L. donovani* promastigotes or *L. chagasi* metacyclic promastigotes. Experiments were started by applying 0.5 ml of promastigotes (50×10^6) or equivalent doses of parasite homogenates (pHMG), to the HCP, for 10 min during interrupted superfusion. A second application was made 30 min later when the permeability increase observed after the first application had been resolved and the cheek pouch had been cleared of FITC-dextran. The first series (I) of experiments consisted of four groups of 6–11 animals each and involved two applications of *L. donovani* promastigotes in each hamster applied at a 30 min interval. In group I.1 (control), the HCP tissues were superfused with normal medium. In group I.2, the superfusate was supplemented with 1 µM of the ACE inhibitor captopril (Cap) (Sigma Chemical Co., St. Louis) for 5–10 min. Group I.3 consisted of superfusate containing Cap and 0.5 µM (final concentrations) of HOE-140, a B₂R antagonist (Aventis Pharmaceuticals, Bridgewater, NJ, USA), added 10 min prior to promastigote application. In group I.4, parasites were pre-treated with 10 µM of N-Pip-F-hF-VSPh (referred to as K11777 in the Figures), an irreversible cysteine protease inhibitor originally developed against cruzain [28]; separate batches were kindly donated by Dr. J.H. McKerrow through Dr. J. Engel (UCSF, San Francisco, CA) and by Dr. J. Palmer (Axis Pharmaceutical). As controls for treatment with N-Pip-F-hF-VSPh, the promastigotes were pre-incubated with buffer containing the same final concentrations of DMSO, used as the solvent. Finally 30 min after the second parasite application ($t = 60$ min), we checked if the HCP responsiveness was still maintained by adding 250 nM BK and 1 µM Cap (final concentrations) to the preparation for 5 min. This final functional test with BK could not be done with HCP preparations that previously received HOE-140 because this high affinity antagonist cannot be efficiently removed from tissues by washings. Rather, at the end of these particular assays, the HCP preparation was challenged with 5 µM histamine for 5 min. Experiments using *L. chagasi* metacyclic promastigotes (series II.1–3), were performed as described above for *L. donovani* promastigotes, except for that the second applica-

tion of *L. chagasi* parasites was not made. Series III consisted of four groups of experiments of five to six animals each, involving two consecutive topical applications of pHMG (equivalent to 50×10^6 promastigotes) with 30 min intervals. In the group III.1 (control), the HCP was superfused with normal medium. Group III.2 consisted of superfusate supplemented with 1 μ M Cap while in group III.3, Cap was combined with 0.5 μ M HOE-140 (III.3). All the experiments were terminated 30 min after the second homogenate application ($t = 60$ min), by applying BK (250 nM) and Cap (1 μ M) for 5 min. Hamsters were randomly allocated to the different treatment schedules within each experimental series. Data are presented as mean \pm S.E.M. Statistical evaluation (between groups) was performed with ANOVA followed by a Student's *t*-test. A *P*-value of 0.05 or less was considered to indicate a statistically significant difference.

2.3. Mouse paw edema

Experiments were conducted as previously described [24], using either male Balb/c, male wild-type (WT) J129, or male J129 B₂R^{-/-} mice [29], each weighing 35–50 g, housed at 22 ± 2 °C with a 12-h light–dark cycle. Some of the animals were pre-treated i.p. with Cap (Sigma, St. Louis, MO), at 4 mg/kg, 1 h before the injection of *L. donovani* promastigotes. Animals under light ether anesthesia received an i.d. injection of 1×10^6 promastigotes suspended in 10 μ l of PBS. As a control, the contralateral paw received the same volume of PBS. The specificity of the B₂R responses was examined by dorsal subcutaneous injection of HOE-140 (200 μ g/kg) 1 h before parasite inoculation. pHMG treatment with N-Pip-F-hF-VSPH (K11777) was performed as described for living parasites in the previous section. Edema was measured with the aid of a plethysmometer at time intervals after i.d. injections and was expressed in microliter (μ l) (the difference in volume between the test and control paws). Statistical evaluations were determined by one-way ANOVA with a *P* = 0.05 significance level. Experiments were made in accordance with current guidelines for the care of laboratory animals and ethical guidelines for experiments in conscious animals.

2.4. Biochemical and enzymatic characterization of promastigote cysteine proteases

After harvesting the *L. donovani* promastigotes at day 7 or *L. chagasi* metacyclics at day 5, the cells were washed twice in Hank's balanced salt saline (BSS) and lysed in 20 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7.2 (PBS) containing 1% NP-40, on ice for 30 min. The soluble fraction was collected by centrifugation at $13,000 \times g$ for 10 min and the protein concentration of the lysates was determined using the Dc-Protein kit (Bio-Rad). The secretion products were obtained upon incubation of washed cells (10^8 per ml) in BSS for 30 min. at 26 °C. The supernatant was collected by centrifugation at $3000 \times g$ for 5 min and filtered in a 0.22 μ m acetate

membrane. The peptidase activity present in lysates (1 μ g/ml protein) or in the supernatants (1:20 dilution) was monitored by the hydrolysis of 5 μ M CBZ-Phe-Arg-MCA in 50 mM Na₂HPO₄, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 6.5, 5 mM DTT, 0.5% DMSO, in a Hitachi-F4500 fluorimeter at 380 nm excitation, 440 nm emission. The initial velocities were calculated by linear regression of the substrate hydrolysis curves. Where indicated, E-64 was added at 30 μ M and N-Pip-F-hF-VSPH (K11777) at 10 μ M, final concentrations. Active-site labeling of the parasite cysteine proteinases was carried out by incubating the parasite lysates (30 μ g) in 50 mM Na acetate buffer, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 5.5, 5 mM DTT or, alternatively, as specificity controls, the same buffer supplemented with 30 μ M of E-64, for 10 min. at room temperature. Labeling of the proteases was achieved by addition of 10 μ M of biotin-aminocaproyl-N-Pip-urea-F-hF-VSPH (biotin-N-Pip-urea-F-hF-VSPH) kindly donated by Dr. J. Palmer (Axys Pharmaceutical, SF, US). The samples were incubated for 1 h at RT and then boiled in SDS-2ME lysis buffer. Proteins were resolved by SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose. The blotted membrane was treated with PBS, 0.05% Tween-20, 9% non-fat milk, followed by incubation with extravidin-alkaline phosphatase (Sigma). Visualization of the reactive products in the blots was done according to manufacturer's instructions.

2.5. Parasite-mediated processing of purified HK

Stationary-phase promastigotes harvested at day 7 were washed twice in saline. The cells were resuspended in HAM pH 6.5 supplemented with 10 μ g/ml of HK (Calbiochem) and incubated for 1 h at 26 °C in the presence of DTT. Protease involvement was studied by adding 10 μ M of N-Pip-F-hF-VSPH (K11777) or 50 mM of EDTA prior to parasite addition. Toxicity was minimal, since the mobility of flagellates was the same as in controls, at the end of the incubation period. Positive controls for HK processing were performed with tissue kallikrein (TK) at 2 μ g/ml. The cell-free supernatants from these suspensions were boiled in SDS-lysis buffer, under reducing conditions. Western blotting was carried out using MBK3 (ascites, tested at 1:5000), an IgG1 mAb directed against the BK epitope of HK/LK [30]. Reaction products on blots were identified using anti-mouse IgG conjugated to alkaline phosphatase, as described above.

2.6. Macrophage infection assays

To determine the influence of kinin system on parasite uptake, monolayers of resident mouse peritoneal macrophages (BALB/c) or spleen adherent cells (isolated from BALB/c mice or hamster as described below) were prepared by plating the cells on glass coverslips. The interaction (host–parasite interaction ratio of 1:5) proceeded for 4 h at 37 °C in RPMI-10% FCS, or in serum-free RPMI, supplemented, or not, with Cap (25 μ M) and/or HOE-140 (100 nM). At the end of this period, the monolayers were fixed with methanol and

stained by hematoxylin–eosin. A replica plate was used to investigate the influence of kinin system activation (during the 4 h interaction period) on extent of intracellular parasite survival, 72 h later. To this end, the macrophage monolayers that had been exposed to the parasites were washed at the end of the interaction period and RPMI-FCS was added for additional 72 h, before being fixed and stained. Mouse resident peritoneal macrophages (BALB/c) were obtained by injecting 5–10 ml of saline into the peritoneal cavity. The cell suspension was washed in saline 3× at 1500 rpm for 10 min and then resuspended in serum-free RPMI. After plating the cells on glass coverslips at 1×10^6 per well in 24 well polystyrene plates (Costar, NY, USA), they were incubated for 4 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. The non-adherent cells were removed by successive washes with saline, while the adherent cell population was incubated for 2 days in RPMI containing 10% of fetal calf serum. To study the effect of exogenous BK or HK on mouse (BALB/c) spleen adherent cells, we added increasing concentrations of BK (5–300 nM) or HK (5–300 nM) to serum-free RPMI medium, prior to addition of parasites. Where indicated, Cap (25 µM) and/or HOE-140 (100 nM) were added to RPMI-10% FCS or serum-free RPMI, immediately before addition of washed promastigotes. To verify if parasite CP contribute to macrophage infection, promastigotes were pre-treated with N-Pip-hF-VSPH/K11777 (10 µM) with 10 min at RT. After removing the excess of the CP inhibitor by centrifugation (2500 rpm, 10 min), the K11777-treated promastigotes were then added to the monolayer of peritoneal macrophages, in the presence of RPMI-10% FCS). Adherent spleen cells, either derived from hamster or BALB/c mice, were obtained after homogenizing the spleens (4–6) in 5 ml of serum-free RPMI. After re-suspending the cells in RPMI medium (GIBCO, Grand Island, NY, USA), they were plated at 4×10^6 per well at glass coverslips in 24 well polystyrene plates (Costar, NY, USA) and incubated for 4 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. After removing non-adherent cells, the adherent cells were further incubated for 5–7 days in RPMI medium supplemented with inactivated 10% FCS, HEPES (10 mM), L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml). By flow cytometry, 59% of the mouse adherent spleen cells were CD11b⁺. Thioglycollate (TG)-elicited macrophages from BALB/c (males) were isolated after inoculating 3 ml of 3% TG (Sigma). Three days later, the exudate peritoneal cells were collected by two washes (5 ml each) of chilled PBS. The cells were then plated (5×10^4 cells per well) on glass coverslips. After 24 h incubation in RPMI-10% FCS, the monolayer of adherent cells was washed 3× with RPMI and the wells were filled with RPMI-10% FCS. The interaction between promastigotes and TG-macrophages (3 h) was carried out in RPMI-10% FCS supplemented, or not, with Cap and/or HOE-140, as described above. Intracellular parasite numbers (per 100 cells) and % infected cells were determined at 72 h post-infection. In these particular experiments, we used Bouin and Giemsa, respectively, to fix and stain monolayers of TG-macrophages. Statistical comparisons were

made with the Kruskal–Wallis test. A *P*-value of < 0.05 was considered to indicate statistically significant differences between means.

3. Results

3.1. *Promastigotes activate the kinin pathway in vivo*

Since mice are relatively resistant to infection by *Leishmania* species that cause visceral leishmaniasis, we started our investigations in the hamster, a susceptible host species that exhibits manifestations that mimic several aspects of the visceral human disease [31]. To study mechanisms underlying *Leishmania*-induced inflammation at early stages of infection, we turned to the hamster cheek pouch preparation (HCP), because it is a convenient model to study the dynamics of plasma exudation or macromolecular leakage by intravital microscopy [32]. The initial experiments (refer to Series I in Section 2) were performed by topically applying stationary-phase *L. donovani* promastigotes to the HCP during interrupted superfusion. First, we studied the effects of parasite addition in HCP superfused with normal medium (Group I.1). Moderate (and transient) macromolecular leakage responses were consistently observed 15 min after *L. donovani* application. (Fig. 1A). Addition of HOE-140 did not prevent induction of this mild venular leakage reaction nor delay its evolution (data not shown), suggesting that it was driven by kinin-independent mechanisms. We then reasoned that kinins eventually generated under these conditions were swiftly degraded by tissue metallopeptidases, such as ACE/kininase II. To address this possibility, the ACE inhibitor captopril (Cap) [33] was added to the superfusate. Indeed, the experiments (Group I.2) showed that permeability responses induced by *L. donovani* were heightened in Cap-HCP (Fig. 1A). First, the maximal response in the Cap group (86 ± 19 leaks per cm²) was significantly (*P* < 0.05) higher than that seen in untreated control (51 ± 3 leaks per cm²). Second, addition of HOE-140 to the Cap-superfusate (Group I.3) reduced macromolecular leakage evoked by *L. donovani* (35 ± 13 leaks per cm²) (Fig. 1A), indicating that the observed enhancement depended on activation of the constitutive B₂R. Analysis of the time course of macromolecular leakage at postcapillary venules indicated that it started within 10 min of parasite challenge in Cap-HCP, that is, the activation response evolved faster than in HCP superfused with normal medium. As with controls, the permeability responses observed in Cap-HCP consistently peaked at 15 min, being resolved at approximately 30 min. Although not recorded or measured, increased rolling and adhesion of leukocytes were observed in postcapillary venules prior to plasma leakage. A second application of promastigotes was made 30 min later, when the HCP has been cleared from extravasated FITC-dextran. At this time, virtually no leaks were observed (see arrow) indicating that the first application of the pathogen induced a state of tachyphylaxis or preconditioning. Interestingly, a prominent leak-

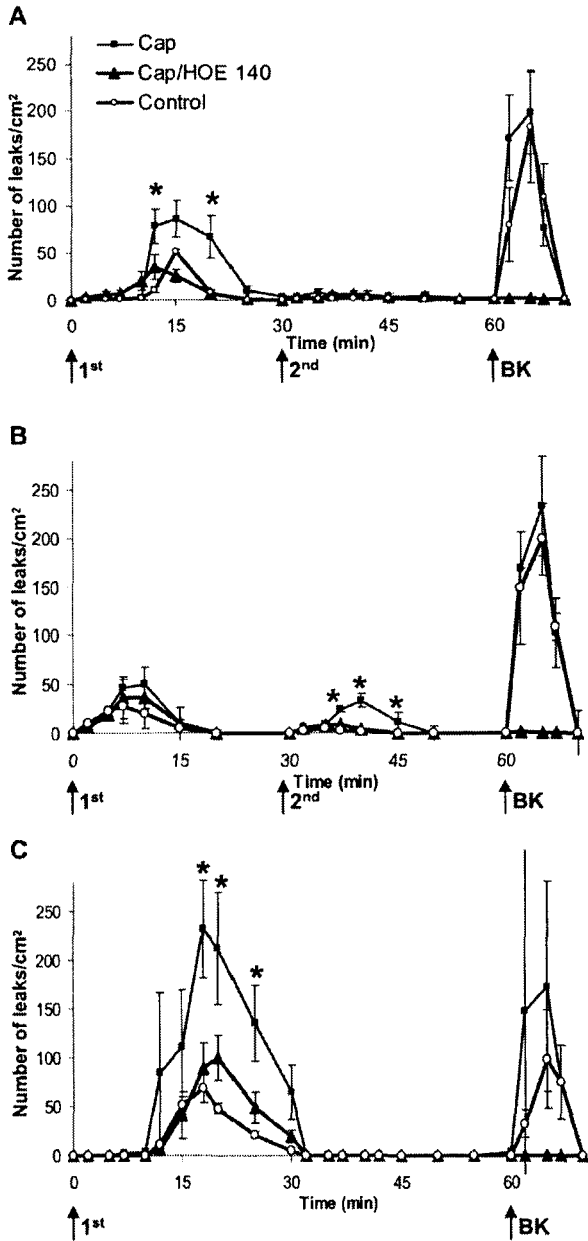


Fig. 1. Plasma leakage in the HCP induced by *L. donovani* and *L. chagasi* promastigotes was enhanced by the ACE inhibitor, captopril.

Three series of hamster experiments were carried out (A–C) in which each series consisted of three groups of animals ($N = 5 - 11$ in each group and altogether 60 hamsters) divided into control (\circ), Cap- (\blacksquare) and Cap+HOE-140-pretreatment (\blacktriangle). In all three series, Cap or Cap+HOE-140 was applied for 5 min prior to the application of promastigotes or their homogenates (0.5 ml of 2×10^8 per ml) that remained on the HCP for 10 min. At 60 min, BK (250 nM) was applied for 5 min. A. Mean number of postcapillary venular leaks following two topical applications of 10^8 parasites (*L. donovani*) on the HCP with 30 min interval. B. Mean number of postcapillary venular leaks following two topical applications of pHMG (homogenates of 10^8 parasites, *L. donovani*) on the HCP with 30 min interval. C. Mean number of postcapillary venular leaks following one topical application of 0.5 ml of 2×10^7 per ml of *L. chagasi* metacyclic parasites. There were no significant ($P > 0.05$) differences between the responses to BK in captopril or control groups in any of the three series but HOE-140 completely blocked the effect of BK. (*) = $P < 0.05$ as compared with control group.

age response was observed after addition of BK at this time (197 ± 43 leaks per cm^2 , $N = 11$), i.e. 60 min after the first and 30 min after the second application of promastigotes. In a separate series of experiments the response to BK at 30 min after the first parasite application was even larger (257 ± 35 leaks per cm^2 , $N = 10$). These results suggested that the state of non-responsiveness to the second application of the parasites was not caused by B_2R down-regulation. At the end of the Series I experiments, BK induced a prominent microvascular leakage, indicating that the HCP was functionally preserved (Fig. 1A).

In the Series II experiments, the Cap-HCP tissues were treated with *L. chagasi* promastigotes. Apart from belonging to a different *Leishmania* complex, the *L. chagasi* preparation used here (isolated from 10% Ficoll gradient cushions) was enriched with complement resistant metacyclic promastigotes (Fig. 1C). Similar to data obtained with *L. donovani* complex, the maximal response in the Cap group (231 ± 50 leaks per cm^2) was significantly ($P < 0.05$) larger than the response in the Cap + HOE-140 (100 ± 23 leaks per cm^2) and the control group (68 ± 14 leaks per cm^2). Moreover, the venular leakage that *L. chagasi* evoked in Cap-HCP was reduced by HOE-140. Of note, the *L. chagasi* metacyclics provoked a larger and more lasting response in Cap-HCP, peaking at 18 min as compared to 15 min observed with *L. donovani* (Fig. 1C). Another difference with respect to *L. donovani*-induced responses was that *L. chagasi* metacyclics were able to provoke significant, albeit moderate B_2R -dependent leakage in the absence of Cap (data not shown). The reasons for the greater dependence of ACE inhibitor on *L. donovani* assays as opposed to those observed with *L. chagasi* are not known, but could relate to qualitative/quantitative differences in the expression of molecules that initiate inflammation by metacyclic versus stationary-phase promastigotes. As to the different kinetics observed with these two species, it is also possible that species specific differences in surface expression of hyaluran-binding proteins [34] may influence the parasite ability to move/migrate through the hyaluran-rich extracellular matrix of the HCP.

The critical role of B_2R in parasite-driven inflammation was further demonstrated by studying *L. donovani*-evoked edema in the mouse paw. As in the studies with the HCP, vigorous edematogenic responses were observed in BALB/c (Fig. 2A) or J129 wild-type mice (Fig. 2B) pre-treated with the ACE inhibitor. The responses in Cap-treated BALB/c were blocked by HOE-140 while the promastigotes failed to evoke significant edematogenic responses in Cap- B_2R (--) mice (Fig. 2B).

3.2. Homogenates of promastigotes activate the kinin pathway in hamster and mice

In a third series of experiments, we asked if infection was critically required for the induction of the microvascular responses induced by the parasites. We first approached this question by testing the effects of *L. donovani* homogenates

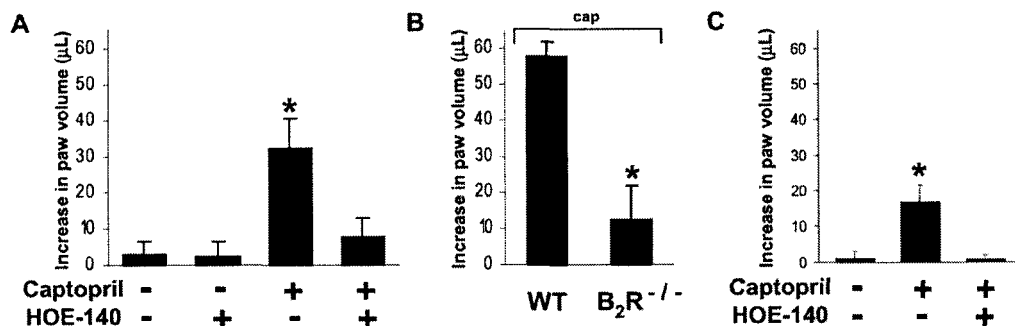


Fig. 2. Captopril potentiates B_2R -driven edema in mice injected with *L. donovani*.

A. Data represent mean values of differences between right and left paw volumes measured 3 h after inoculation of 10×10^6 promastigotes in the right paw of BALB/c mice while the contralateral paw was injected with PBS. Cap (4 mg/kg) was injected i.p. 1 h before parasite inoculation ($N = 5$), while a second group of mice received PBS as a control. The third group was pre-treated with Cap and HOE-140 (200 μg/kg). B. *L. donovani* promastigotes were inoculated in the paw of male wild-type (WT) J129, or male J129 $B_2R^{-/-}$ mice. Both groups received Cap (4 mg/kg) 1 h prior to infection. (*) = $P < 0.05$. C. Edema (3 h) induced by pHMG (equivalent to 10×10^6 *L. donovani*) inoculation in the mouse paw. Mice were pre-treated with Cap or HOE-140 as described above. Each group consisted of 5 mice. (*) = $P < 0.05$

(pHMG) (Fig. 1B)—the dose used being equivalent to that of living promastigotes. Unlike the potent but protracted B_2R -driven leakage responses elicited by living parasites (see for comparison Cap-HCP, in Fig. 1A), the microvascular reaction induced by pHMG/Cap was mild ($P < 0.05$) but evolved faster, peaking within 5–10 min of topical application (Group III.1), being extinguished more rapidly than observed with living parasites (Fig. 1A). It is noteworthy that Cap-HCP responded to the second (consecutive) application of pHMG (Fig. 1B), i.e. we did not observe the characteristic tachyphylaxis induced after the first stimulation by living promastigotes (see for comparison Fig. 1A). Interestingly, the macromolecular leakage elicited by the first application of pHMG did not significantly involve the kinin pathway (Fig. 1B) because the responses were only marginally increased by Cap (Group III.2) and HOE-140 did not significantly reduce these permeability changes ($P > 0.05$), irrespective of the presence or absence of Cap (Group III.3). Strikingly, however, addition of the ACE inhibitor significantly augmented the leakage induced by the second pHMG application, 30 min later ($P < 0.05$) (Fig. 1B) and this response was abrogated by HOE-140 ($P < 0.05$). Hence, our data suggest that the primary inflammatory response evoked by pHMG (i.e. driven by kinin-independent pathways) has rendered the microvascular bed more sensitive to the endogenously released kinins generated upon the second pHMG challenge (B_2R dependent). Assays in the mouse model (paw edema) confirmed that pHMG induces permeability changes via B_2R (Fig. 2C). Like the effects of living parasites, the edematogenic responses induced by pHMG are down-regulated by ACE.

3.3. Activation of the kinin pathway in vivo depends on the activity of *L. donovani* cysteine proteinases

As mentioned in the introduction, previous studies on *T. cruzi* trypomastigotes have linked the activation of the kinin system to the activity of cruzipain, the parasite's major cys-

teine proteinase (CP; reviewed in [35]). Given indications that *L. donovani* promastigotes also express developmentally regulated cathepsin L-like CP [36], we first asked if *L. donovani* could rely on CP to activate the kinin system. We first evaluated if parasite pre-treatment with N-Pip-F-hF-VSPH (K11777) would impair their ability to activate the mouse kinin pathway in vivo. Indeed, the results (Fig. 3B) show that the edema evoked by K11777-treated promastigotes was significantly attenuated in Cap-BALB/c, as compared to responses induced by control parasites. Consistent with these results, an attenuated microvascular leakage response was observed when we applied K11777-treated promastigotes to Cap-HCP (Fig. 3A). Combined, these experiments suggest that *L. donovani* promastigotes share with *T. cruzi* the ability to activate the kinin pathway through cysteine proteinases. Further, the potentiation observed in Cap-treated animals implies that ACE down-modulates the otherwise robust inflammatory response that these pathogens can evoke in mammals. Consistent with these results, K11777-treated pHMG did not induce significant edema in Cap-mice (data not shown).

3.4. *L. donovani* promastigotes liberate kinins from HK through the activity of cysteine proteinases

Whether exposed at the cell surface or originating from extravasated plasma, kininogens must be properly processed in order to release kinins. In a previous study [23], we used Western blotting with mAb MBK3 to identify the bradykinin epitope (domain 4) in soluble HK molecules incubated with living *T. cruzi* trypomastigotes. Here we extended this analysis to *L. donovani* promastigotes. First, we checked if the parasites generated HK fragments, identified with a mAb (HKL13) directed against its light chain. The degradation profiles were too complex (data not shown), resembling of those described for HK processing by cruzipain [23]. Most importantly, however, was the profile observed with MBK3 (Fig. 4).

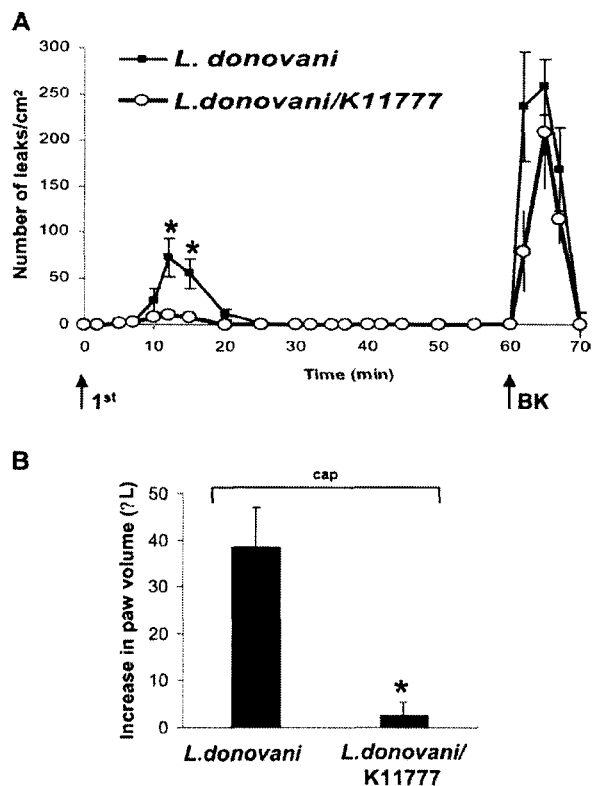


Fig. 3. Parasite cysteine proteinases are required for kinin pathway activation in vivo.

A. Comparison of permeability inducing properties of living *L. donovani* promastigotes pre-treated with 10 μ M of the irreversible cysteine proteinase inhibitor N-Pip-F-hF-VSPh (K11777) versus PBS/DMSO-treated controls. Data represent mean number of postcapillary venular leaks following two topical applications of parasites (control or pre-treated with K11777) at 0 and 30 min followed by one final application of BK (250 nM) at 60 min (see arrow). The HCP was superfused with 1 μ M of Cap. (*) = $P < 0.05$. **B.** Edema induced by paw inoculation of *L. donovani* promastigotes in Cap-treated BALB/c mice. The parasites were pre-treated with K11777, as described above.

First, our positive control shows that the BK epitope was lost when HK was treated with tissue kallikrein (Fig. 4, track e) or when it was incubated with *L. donovani* promastigotes (Fig. 4, track b). Interestingly, addition of N-Pip-F-hF-VSPh (K11777) to the parasite suspension partially inhibited the proteolytic excision of the BK epitope from intact HK molecules (Fig. 4, track c). As an additional control, the addition of EDTA, aimed at inhibiting metalloproteinases, such as Gp63 [37], had only marginal protective effects on the BK display (track d), thus ruling out an important role for these developmentally regulated metalloproteinases. Our data suggest that whether acting alone or in conjunction with other parasite proteinases, *L. donovani* cysteine proteinases may efficiently process HK, the reaction being coupled to liberation of the bradykinin moiety. Assays performed with *L. chagasi* metacyclic promastigotes indicated that BK was also released from HK, but at lower efficiency as compared to *L. donovani* (data not shown).

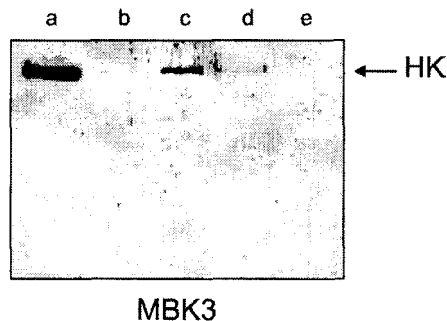


Fig. 4. Parasite-mediated processing of HK is cysteine proteinase dependent and promotes excision of the BK epitope. Stationary-phase *L. donovani* promastigotes were resuspended in HAM (pH 6.5) supplemented with 10 μ g/ml of HK and incubated for 1 h at 26 °C in the presence of DTT. Involvement of cysteine proteases and metalloproteinases were studied by adding 10 μ M of N-Pip-F-hF-VSPh (K11777) or 50 mM of EDTA. At the end of the incubation period, parasite motility was the same as in untreated controls. The cell-free supernatants were boiled in SDS-2-ME lysis buffer. Western blotting carried out using mAb anti-BK (MBK3). Positive controls for proteolytic excision of BK were performed by mixing tissue kallikrein (2 μ g/ml) with the HK sample. Arrow indicates position of intact HK chain (118 kDa). Lanes (a), HK control; (b), HK + Promastigotes; (c), HK + N-Pip-F-hF-VSPh-treated-promastigotes; (d), HK + EDTA-treated-promastigotes; (e), HK + TK.

3.5. Molecular characterization of kininogenases from *L. donovani* and *L. chagasi*

Considering that *L. donovani* and *L. chagasi* cysteine proteinases are sensitive to N-Pip-F-hF-VSPh (K11777), we set out to investigate their biochemical properties in NP-40 lysates from *L. donovani* and *L. chagasi* promastigotes. In both species, we detected E-64 and K11777-sensitive peptidases in either (i) living parasites (Fig. 5A) (ii) culture supernatants (Fig. 7B) and (iii) NP-40 lysates (Fig. 5B; for brevity, only the data with *L. donovani* is illustrated). The active enzymes present in NP-40 lysates were characterized by affinity-labeling the *L. donovani* cysteine proteinase(s) with biotin-N-Pip-urea-F-hF-VSPh. As specificity controls, we pre-incubated the lysates with E-64, prior to treatment with the biotinylated N-Pip-urea-F-hF-VSPh probe. The biotinylated reaction products (Fig. 5C) identified papain-like enzymes of 35–40 kDa as the *L. donovani* targets of N-Pip-urea-F-hF-VSP.

3.6. Activation of the kinin pathway modulates the uptake of promastigotes by macrophages

Earlier work with *T. cruzi* [21,23] suggested that cruzipain-mediated proteolysis of HK may occur when the kinin precursor proteins bind to heparan sulfate or other surface binding sites on endothelial cells [38,39]. Initial studies with *L. donovani* suggested that similar mechanisms underlie parasite uptake by mouse peritoneal inflammatory macrophages (P.R. Batista and J. Scharfstein, data not shown). Encouraged by these preliminary data, we then examined if HK could serve as kinin precursors for *L. chagasi* CP during the patho-

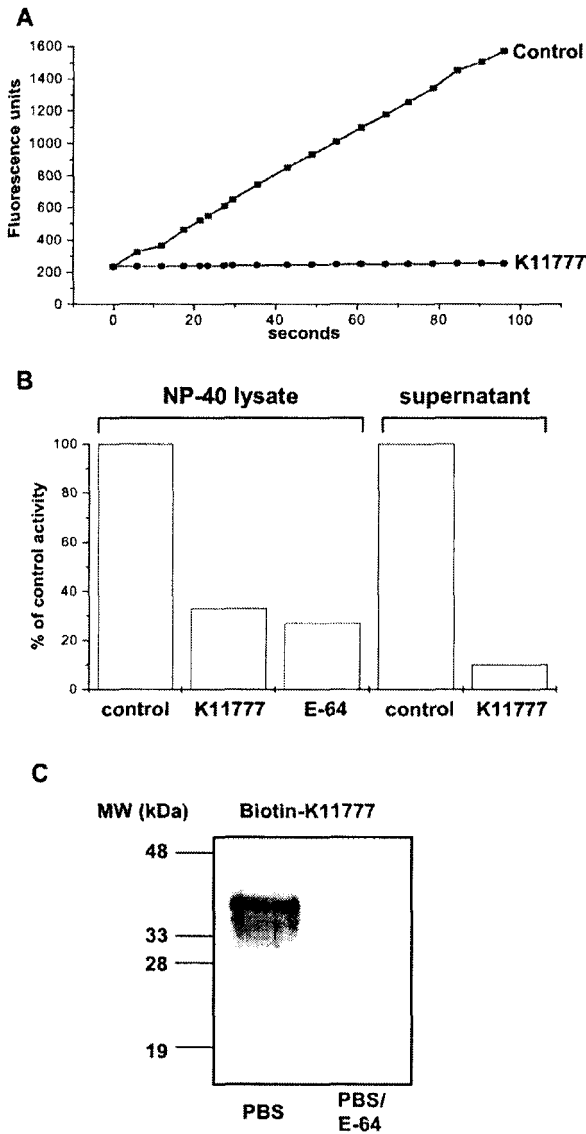


Fig. 5. Molecular characterization of *L. donovani* cysteine protease(s). (A) Promastigotes obtained after 7 days of culture were lysed in PBS-1% NP-40 on ice. The soluble fraction was recovered by centrifugation and the peptidase activity of the lysates (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was monitored by the hydrolysis of CBZ-Phe-Arg-MCA. (A) The plot shows the increase of fluorescence with time, reflecting product formation. The synthetic cysteine protease inhibitor N-Pip-F-hF-VSPh (K11777) was added at a 10 μM final concentration. (B) The peptidase activity contained in lysates and in culture supernatants was monitored as described in A. E-64 and N-Pip-F-hF-VSPh were added at 30 μM and 10 μM final concentration, respectively. The % of inhibition was determined by comparing the initial velocities (as described in Section 2), where control was estimated as 100%. (C) Active-site labeling of cysteine proteases was accomplished by treating parasite lysates (30 μg) with 10 μM of biotin-coupled N-Pip-F-urea-hF-VSPh for 1 h. RT (lane 1); or in the same buffer supplemented with 30 μM of E-64, prior to the addition of the biotinylated probe (lane 2). The samples were separated by SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose and the reactive products were visualized upon treatment with avidin-alkaline phosphatase.

gen's interaction with macrophages. In the first series of experiments (Fig. 6A–C), we determined the extent of parasite uptake after 4 h interaction with spleen adherent cells

(59% CD11b positive) isolated from BALB/c mice. Addition of BK, over a range of concentrations (5–300 nM) to Cap-RPMI medium (serum-free), modulated parasite uptake by the spleen adherent cells, yielding a bell-shaped dose-effect profile (Fig. 6A). At low concentrations of BK, the number of internalized amastigotes gradually increased, peaking at 10 nM BK (Fig. 6A) ($P < 0.001$). In contrast, adherent spleen cells treated with high-doses of BK (100–300 nM) showed reduced numbers of internalized parasites ($P < 0.001$), most likely reflecting down-regulation of B_2R by agonist excess (Fig. 6A). The same bell-shaped profile was also observed when the effect was calculated as the percentage of cells infected (data not shown). Given indications that BK modulates promastigote uptake by the mouse spleen adherent cells in a dose-dependent manner, we then asked if purified (human) HK could serve as an exogenous source of kinin precursor protein, the underlying premise being that the parasites would rely on CP to liberate the B_2R kinin agonist, as suggested by previously presented data (Figs. 3 and 4). Indeed, the results showed that HK (5–300 nM) induced dramatic changes in parasite uptake by spleen adherent cells (Fig. 6B). As in the bell-shaped profile induced by BK, addition of excess HK (>100 nM) to Cap-medium reduced parasite uptake to baseline levels ($P < 0.001$). Peak values for HK were observed at slightly higher concentration (30 nM) ($P < 0.001$) than BK, suggesting that about 30% of the exogenously supplied HK proteins were quantitatively converted into B_2R agonists during the 4 h period of host-parasite interaction (Fig. 6B). Further, the stimulation of parasite uptake observed at the optimal (30 nM) dose of HK was abolished by HOE-140 (Fig. 6C). These results suggested that HK modulated parasite uptake by mouse spleen adherent cells via release of the B_2R agonist, rather than acting merely as cell adhesive molecules [40]. To verify if the B_2R agonist was released from HK (tested at 30 nM) via parasite cysteine proteinases, we added the CP inhibitor K11777 (10 μM) to the Cap-RPMI medium. The results (Fig. 6C) show that uptake of K11777-treated promastigotes by mouse adherent spleen cells was significantly reduced ($P < 0.01$), and to the same extent as the B_2R antagonist, HOE-140. Furthermore, the combination of K11777 and HOE-140 did not further attenuate parasite uptake by the spleen adherent cells (Fig. 6C), suggesting that HK and CP are components of the same activation pathway. We then checked if these findings were also applicable to spleen adherent cells, isolated from the hamster. Addition of Cap alone to the hamster adherent cells (i.e. in the absence of exogenous BK or HK) led to a slight increase ($P < 0.05$) in parasite uptake (Fig. 6D). Albeit mild, this enhancement was abolished by HOE-140 (Fig. 6D). These results suggest that endogenous kininogens, either adsorbed from bovine serum on cell surfaces [23] or synthesized de novo by the hamster spleen cells, may have served as "endogenous" kinin precursor molecules. Consistent with data shown for mice spleen adherent cells (Fig. 6A), addition of 50 nM BK to Cap-medium further increased parasite uptake by hamster spleen cells, whereas HOE-140 antagonized these effects ($P < 0.05$)

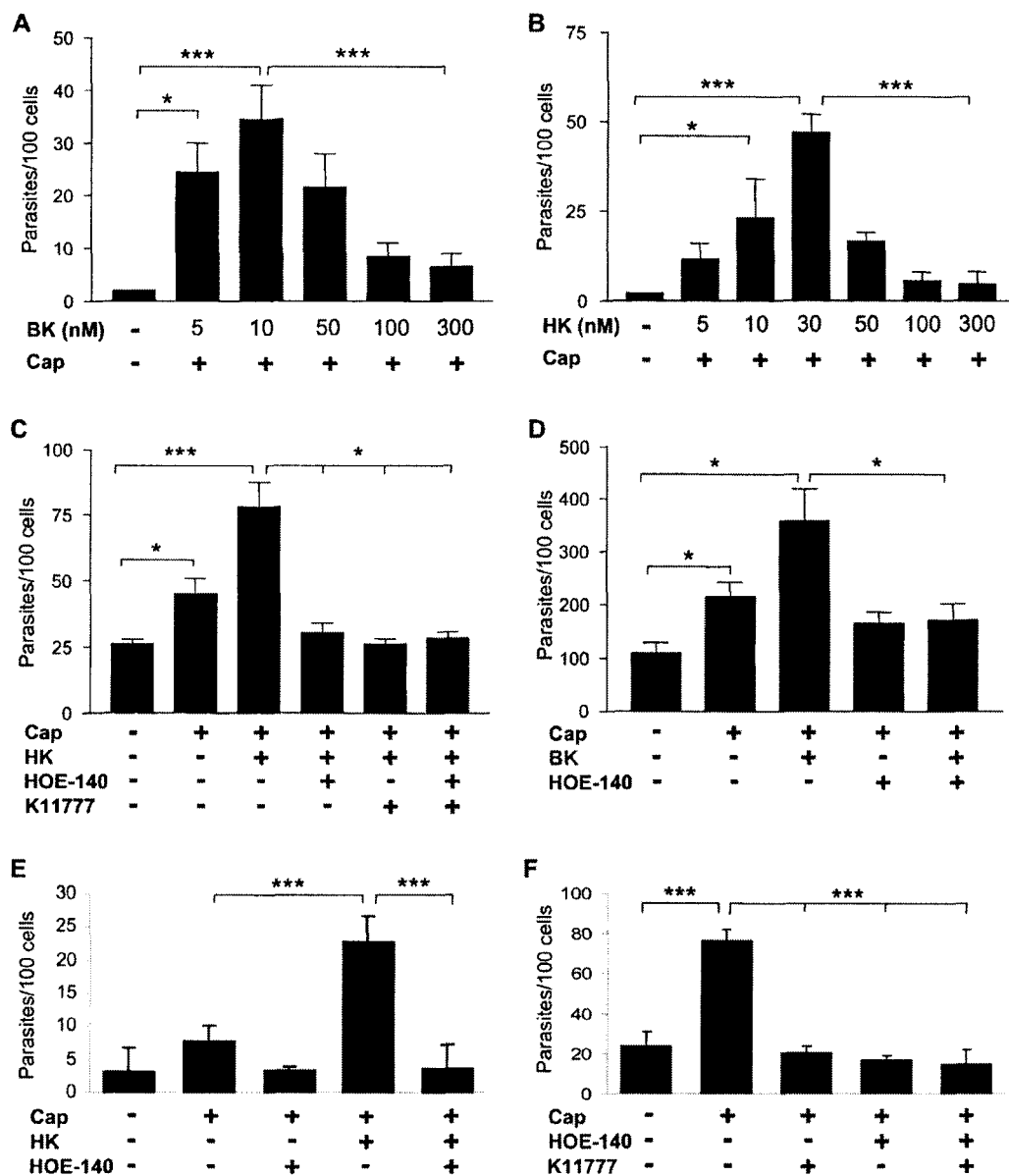


Fig. 6. Activation of B_2R modulates uptake of promastigotes by macrophages. **A**. Dose-dependent effects of exogenous BK. Mouse (BALB/c) spleen adherent cells were incubated with Cap (25 μ M) in serum-free RPMI supplemented with BK (5–300 nM) 5 min before addition of *Leishmania* promastigotes (parasite:macrophage ratio of 5:1). The interaction proceeded for 4 h in RPMI. **B**. Dose-dependent modulation of parasite uptake by purified HK. Same cells as described above, using HK (5–300 nM) and Cap. **C**. Interplay of cysteine proteinases, ACE and HK in the modulation of promastigote uptake by adherent spleen cells. Interaction was performed in serum-free RPMI, as described above, in the presence or absence of HK (30 nM), Cap (25 μ M), HOE-140 (100 nM), and/or the cysteine protease inhibitor K11777 (10 μ M). **D**. HK modulates uptake of promastigotes by hamster spleen adherent cells. Interaction of hamster spleen adherent cells with *L. chagasi* promastigotes (5:1) was carried out for 4 h in serum-free RPMI supplemented with BK (30 nM). Where indicated, HOE-140 (100 nM) was added to Cap-medium. **E**. Activation of B_2R stimulates uptake of promastigotes by mouse resident peritoneal macrophages. Promastigotes were incubated with BALB/c resident peritoneal macrophages for 4 h in serum-free medium supplemented, or not, with Cap (25 μ M), HK (30 nM) and/or HOE-140 (100 nM). **F**. Interplay between parasite cysteine proteinases, serum-bovine kininogens and ACE influences the extent of parasite uptake by mouse resident peritoneal macrophages. Interaction with resident peritoneal macrophages was performed as described above, except for the presence of 10% FCS in the RPMI medium. The influence of parasite CP was tested by pre-incubating (10 min) stationary-phase promastigotes with K11777 (10 μ M). After removing the excess of K11777 by washing, the K11777-treated promastigotes were added to the interaction medium, in the presence or absence of Cap and/or HOE-140. Data values for % infected cells (not shown) matched number of parasites per 100 host cells. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$ for difference between groups.

(Fig. 6D). In short, these data suggest that, irrespective of the origin of spleen adherent cells, i.e. mice or hamsters, parasite-induced activation of B_2R stimulates pathogen uptake by spleen adherent cells. Of note, the potentiating effects of Cap

suggest that this kinin-driven cellular response is tightly regulated by ACE.

Given that spleen cells contain a heterogeneous population of macrophages, the above experiments were repeated

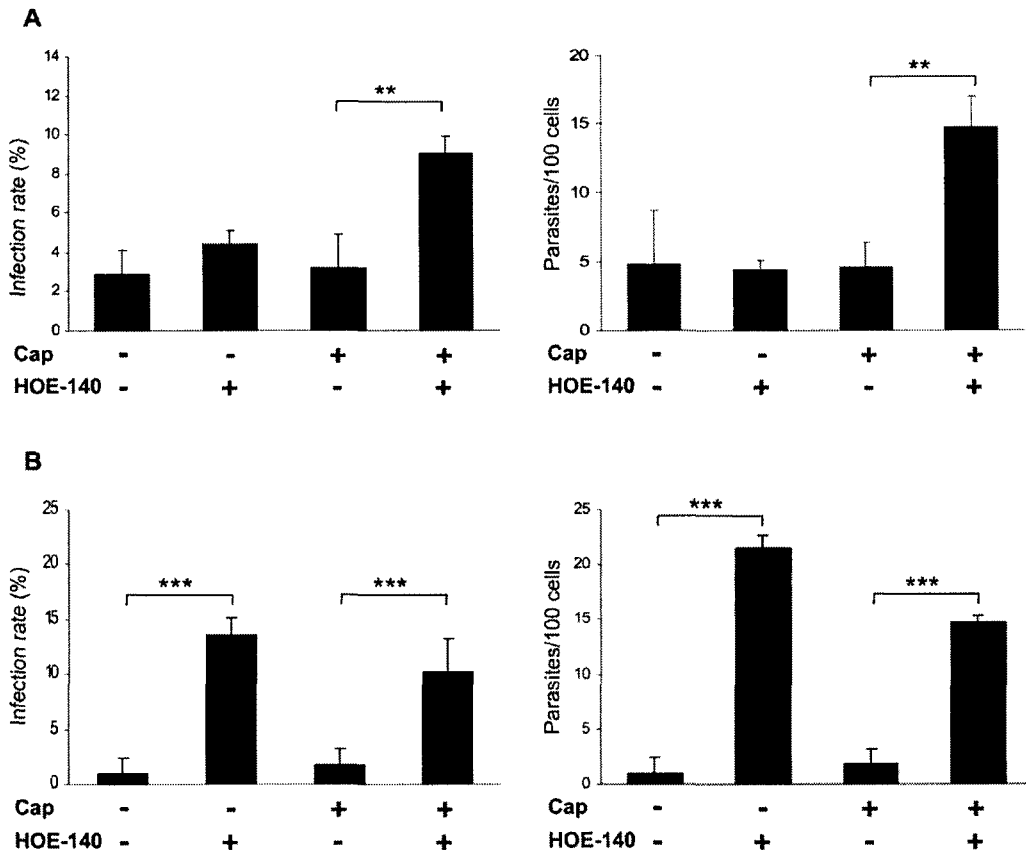


Fig. 7. Intracellular amastigote outgrowth in resident or TG-induced macrophages is differentially modulated by ACE and B_2R . **A**, kinins and ACE modulate amastigote outgrowth in resident peritoneal macrophages.

The 4 h host–parasite interaction was carried out in RPMI-10% FCS, supplemented or not with Cap and/or HOE-140. At the end of this period (4 h), the parasites remaining in supernatants were removed, the wells were washed, and fresh RPMI-FCS was added for another 72 h. **B**, B_2R modulates amastigote outgrowth in TG-induced macrophages. Interaction between host and parasites were carried out in RPMI-FCS as described above. Results are expressed either as % infected cells (left panel) or number of intracellular amastigotes/100 macrophages (right panel). (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$ for difference between groups.

with mouse peritoneal macrophages. As in the previous assays, the interaction with resident peritoneal macrophages (BALB/c) was initially performed in serum-free RPMI medium. Addition of Cap alone had little effect on parasite uptake by resident macrophages. However, the parasite internalization was greatly enhanced ($P < 0.001$) upon addition of purified HK to the Cap-treated cultures (Fig. 6E). We noted that the baseline levels of parasite uptake observed in the absence of Cap (see left bar, Fig. 6E) were far lower than expected for fully functional phagocytic cells. This raised concerns that serum-deprivation, during the host–parasite interaction period (4 h), had decreased the phagocytic activity and, possibly, other key functions of mouse peritoneal macrophages. To eliminate this potential artifact, macrophage–parasite interactions were then exclusively carried out in medium containing RPMI-10% FCS. As anticipated, baseline levels of parasite uptake by the macrophages were now markedly increased (about eightfold, see Fig. 6F, control bar) as compared to the baseline values observed in the absence of serum (Fig. 6E). The addition of the ACE inhibitor again stimulated increase in parasite uptake ($P < 0.001$) (Fig. 6E).

Furthermore, the Cap-driven potentiation of parasite uptake by resident macrophages was blocked by HOE-140, further implicating the B_2R activation pathway in this process (Fig. 6F). In the same set of experiments, we again used K11777 to verify if the activity of parasite-derived CP was required for B_2R -driven uptake of parasites in RPMI-10% FCS. To eliminate risks of non-specific effects of K11777 on macrophage CP, the promastigotes were pre-treated for 10 min with K11777. After removing the excess of irreversible CP inhibitor from the cultures, we added K11777-treated promastigotes to the RPMI-FCS cultures. The data revealed that macrophages did not efficiently internalize K11777-treated promastigotes (Fig. 6E). These data suggest that generation of B_2R agonists in the cultures may depend on parasite CP-mediated processing of bovine serum kininogens.

3.7. Parasite survival in resident and TG-macrophages is differentially modulated by B_2R and ACE

After demonstrating that kinin pathway activation modulates promastigote uptake by resident macrophages, we stud-

ied the fate of the internalized parasites, 72 h later. In this set of experiments, promastigotes were incubated with macrophages (4 h) in RPMI-10% FCS, in the presence (or not) of Cap and/or HOE-140. At the end of this period, the cultures were washed, and then incubated with fresh RPMI-FCS for another 72 h. Our results (Fig. 7) indicate that the increased parasite uptake observed after 4 h of cellular interaction in Cap-medium (RPMI-FCS) (Fig. 6F) did not translate into increased parasite survival (Fig. 7A), whether measured as percentage of infected cells (Fig. 7B, left panel) or number of intracellular amastigotes/100 cells (Fig. 7B, right panel). The presence of HOE-140 alone in the cellular interaction (4 h) medium (RPMI-10%FCS) did not stimulate parasite survival, 72 h post-infection. Surprisingly, however, a vigorous increase (19 fold) of intracellular amastigotes was observed in cultures (72 h post-infection) that had been treated, during the 4 h interaction period, with both Cap and HOE-140 ($P < 0.05$) (Fig. 7A). The finding of this prominent amastigote burden at 72 h post-infection indicates that blockade of B_2R signaling and ACE activity during the 4 h interaction period has converted resident macrophages into more susceptible hosts for *L. chagasi*. In other words, the combined action of HOE-140 and Cap on resident macrophages suppressed the host protective responses that, in normal cells, efficiently constrain intracellular amastigote outgrowth.

We then asked if activation of the kinin system modulated parasite survival in inflammatory macrophages. Strikingly, the results showed that here, presence of HOE-140 during the 4 h interaction period vigorously stimulated parasite survival (72 h post-infection) in TG-macrophages (Fig. 7B, left and right panels). Importantly, the ACE inhibitor was not required here, indicating that HOE-140 mediated blockade of B_2R signaling was sufficient to suppress the innate responses of TG-macrophages, converting them into highly susceptible host cells.

4. Discussion

This study was initiated because the innate immune system is known to be modulated by kinin peptides [13] and its principal aim was to establish if the kinin pathway was activated by the *Leishmania* species that cause visceral leishmaniasis. The choice of the hamster as one of the animal models was based on the fact that this particular species reproduces the pathological manifestations of visceral leishmaniasis observed in humans. Initially, our intravital microscopy studies showed that in the absence of ACE inhibitors, the *L. donovani* promastigotes evoked moderate but significant microvascular leakage, via kinin-independent pathways. *L. chagasi* metacyclics also induced moderate leakage in absence of Cap, but this response was abolished by HOE-140 (data not shown). We are currently studying if differences in parasite-induced activation of complement [2,4,41] or production of PAF [42] may influence the extent of kinin system activation. In order to improve the detection of short-lived kinin peptides, pro-

duced in tissues exposed to promastigotes, we used a strategy that had proved rewarding in our previous studies of endothelial interactions with *T. cruzi* [21,23,24]. This involved blockade of kinin-degradation pathways by pre-treating the HCP or mice with ACE inhibitor, prior to challenge with parasites. Pharmacological interventions, combined with the use of $B_2R^{-/-}$ mice, showed that the macromolecular leakage (hamster) and edematogenic inflammation induced by *L. donovani* or *L. chagasi* promastigotes in animals pre-treated with Cap depended on activation of B_2R by endogenously released bradykinin or lysyl-bradykinin. Time course studies revealed that the B_2R -dependent leakage induced by promastigotes evolved rather slowly in the Cap-HCP. The response was clear by 10 min after parasite application, it peaked at 15 min and decreased sharply thereafter. These temporal dynamics contrasted with the immediate response induced by topical application of histamine or bradykinin, which typically peaked after 2 min, but not later than 5 min [43,44], and were also different from the vascular leakage observed after ischemia/reperfusion (peak value at 10 min of reperfusion), a process caused by activated leukocytes [45]. Our finding that *L. chagasi* promastigotes elicited a somewhat delayed response (peaking at 18 min) as compared to *L. donovani* (15 min) is intriguing, in view of the overall similarities of the activation profile of these species. The reasons for this difference in kinetics are not known, but could possibly be related to differential ability of these flagellates to move or migrate through the hyaluran-rich extracellular matrix of the HCP [34].

Although not quantified here, we have consistently observed increased rolling/adhesion of leukocytes in postcapillary venules soon after promastigote application. This is of interest in the light of studies in the rat mesentery showing that application of high-doses of synthetic BK caused leukocyte rolling/adhesion to the endothelium by a P-selectin and ICAM-1 dependent pathway, due to the action of oxidative products generated via cytochrome P-450 [46]. Interestingly, recent observations made in a mouse airpouch model indicate that *Leishmania*-induced neutrophil migration within a few hours, the cellular responses being coupled with formation of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) [47]. At the present time, the nature of the mediators that induce early leukocyte-endothelium adherence in Cap-HCP exposed to *L. donovani* or *L. chagasi* promastigotes is unknown. Rather than kinins, inflammation evoked by promastigotes of the *L. donovani* complex may also depend on pattern recognition by innate immunity receptors, such as those from the Toll-like receptor (TLR) family [48]. The complement system is another pathway worth considering in this context, because there is evidence that complement anaphylatoxins induce microvascular leakage in the cheek pouch [49]. In addition, activation of the complement system was previously implicated in the acute inflammatory process, which *L. chagasi* promastigotes induced in hamsters [41]. Hence, whether induced by anaphylatoxins, by TLR-dependent activation of leukocytes [48], or by other as yet uncharacterized activation

mechanisms, impairment of the integrity of the endothelial barrier at very early stages of inflammation elicited by *L. chagasi* or *L. donovani* may allow efflux of plasma proteins, including kininogens, into extravascular infection sites. Acting further downstream, parasite proteases may then process the rapidly accumulating kinin precursor proteins, liberating high levels of kinins that, acting through B₂R, further amplify the initial inflammatory reaction.

Studies with homogenates of promastigotes offered clues to the molecular basis of this process. First, we found that the kinin system can be activated without need of active infection. Assays with parasite homogenates (pHMG) indicated that diffusible pro-inflammatory molecules are entrapped within dead/disrupted parasite cells. pHMG evoked rapid macromolecular leakage (peaking at 10 min, Fig. 1B), a feature that contrasts to the relatively protracted (15 min) permeability responses induced by living *Leishmania* flagellates. Of note, HOE-140 did not block the microvascular leakage elicited by the primary pHMG provocation, suggesting that inflammation is initiated by a kinin-independent route. By contrast, the B₂R antagonist efficiently blocked the leakage response elicited by the subsequent pHMG challenge. These results suggest that activation responses elicited by the first pHMG provocation may have rendered the pouch's microvascular bed hypersensitive to the B₂R agonists, formed by the second application of the homogenates. As already discussed, it is possible that the plasma leakage induced by the first pHMG stimulus led to accumulation of blood-borne kininogens, the kinin precursor proteins, into to extravascular tissues. Upon second provocation, the CP entrapped within pHMG may then generate kinins, activating the endothelium via B₂R.

Assays performed with the cysteine proteinase inhibitor N-Pip-F-hF-VSPh (K11777) [28] suggested that promastigote-derived CP participate in the molecular mechanisms underlying kinin system activation *in vivo* (i.e. mouse model of inflammation in the paw and microvascular leakage in hamster cheek pouch) and *in vitro* (parasite uptake by macrophages). It remains to be determined if this process is facilitated by other peptidases, either from parasite or host origin. However, immunochemical studies revealed that K11777 could inhibit *L. donovani*-mediated processing of purified HK, an enzymatic reaction that is coupled to excision of the kinin moiety from soluble HK. Affinity-labeling of parasite lysates with biotin-N-Pip-F-hF-VSPh characterized these CP as enzymes with apparent molecular weights of 35–45 kDa. These values are lower than predicted for the full length product of cathepsin L-like genes [36], most likely because they correspond to mature enzymes that have lost their proteolytic-sensitive C-terminal extension, as reported for other type I CP described in various pathogenic trypanosomatids [50]. Systematic analysis of the substrate specificity of individual recombinant CP isoforms from *L. chagasi* and *L. donovani* promastigotes is required to characterize the molecular mechanisms underlying the kinin-release reaction. The possibility that the kinin-releasing CP activity of promastigotes

may be upregulated by extracellular matrix constituents (e.g. hyaluran) is worth considering, in view of previous studies with *T. cruzi* showing that heparan sulfate proteoglycans positively modulate cruzipain-mediated processing of HK [23]. It was suggested that the activity of cystatin-like domains of HK (which otherwise function as potent CP inhibitors) is constrained as result of mutual cooperative interactions of heparan sulfate chains with both HK and cruzipain, the end result being increased liberation of bioactive kinins [50].

As a surface peptidase expressed by macrophages [51], ACE (CD143) may also modulate the outcome of kinin-driven interactions with *L. chagasi*. Indeed, assays of parasite uptake indicated that ACE down-modulates the macrophage responses which kinins otherwise convey via B₂R. First, we showed that addition of exogenous BK or HK to serum-free (Cap-treated) macrophage cultures modulated parasite uptake in a dose-dependent manner, due to the activation of B₂R. The bell-shaped dose-effect profiles induced by BK were rather similar to the previously reported B₂R-driven potentiation of *T. cruzi* infectivity of non-phagocytic cells [21,24]. Moreover, the findings that macrophages exposed to K11777-treated promastigotes did not efficiently internalize these pathogens further suggest that the catalytic activity of *L. chagasi* CP is required for parasite-mediated generation of B₂R agonists.

It is noteworthy that in all the *in vitro* systems tested, irrespective of (i) presence or absence of serum in the interaction medium (ii) species (hamster or mouse) or (iii) tissue origin of macrophages (peritoneal versus spleen), the parasite uptake was drastically enhanced upon addition of ACE inhibitor (Cap) to the interaction medium. Further, HOE-140 consistently antagonized the potentiating effects which Cap induce on parasite uptake, thus implicating the B₂R signaling pathway as the transducer of this innate effector response in macrophages. Additional studies are required to determine if activation of kinin/B₂R signaling pathway exerts this role by upregulating surface expression and/or activity of phagocytic receptors such as mannosyl/fucosyl receptors, CR3 [3,52] or via scavenger receptors. Alternatively, kinins may stimulate active cellular invasion, perhaps engaging the B₂R/[Ca²⁺]_i-dependent mechanism which drive *T. cruzi* infection of endothelial cells and cardiomyocytes [21,24].

The fate of the promastigotes that were internalized via the kinin/B₂R-dependent and independent routes was also investigated in our experiments. We performed these studies with resident peritoneal macrophages rather than spleen adherent cells, thus avoiding uncertainties related to heterogeneity of the mouse or hamster spleen macrophage population. Moreover, the interaction between parasites and peritoneal macrophages (4 h) was performed in RPMI-(10%) FCS, rather than in serum-free medium, to exclude stress-related effects caused by serum deprivation. Our results showed that the increased uptake of promastigotes by resident macrophages, i.e. the Cap-induced effects, resulting from increased activation of B₂R (see effect of ACE inhibitor; Fig. 6D) did not translate into increased amastigote survival (assessed 72 h

after initial host–parasite interaction, see Fig. 7A). On the contrary, the numbers of amastigotes (or % infected macrophages) found in Cap-cultures were as low as those of control macrophage cultures (Fig. 6D), notwithstanding the fact that these macrophages had initially internalized high numbers of promastigotes (Fig. 6F). Intriguingly, the addition of HOE-140 to the Cap-treated cultures drastically increased parasite survival at 72 h (Fig. 7A, B). Considering that the low parasite uptake observed at the end of the 4 h interaction period (see data for HOE-140 + Cap, Fig. 6F), the finding of increased parasite burden at 72 h post-infection suggests that early blockade of B₂R, when combined with ACE inhibition, converts the relatively resistant, resident macrophage into a highly susceptible host cell. Thus, the effects of the ACE inhibitor on the host–parasite interactions introduced a bias in the innate response of resident macrophages, somehow linking ACE function to regulation of the kinin/B₂R activation pathway.

In contrast to the above studies, analysis of inflammatory (TG-elicited) macrophages revealed that ACE inhibition not necessary for the kinin/B₂R-dependent control of intracellular parasite outgrowth. Here, parasite survival was drastically increased in cultures supplemented with HOE-140, irrespective of presence or absence of Cap. These data suggest that B₂R on TG-macrophages may have a lower activation threshold for kinins. Although not investigated here, it will be worth determining if the kinin/B₂R signaling pathway may negatively modulate mechanisms underlying TGF- β production by macrophages. This possibility is intriguing, in light of recent evidence identifying *L. chagasi*-derived CP as enzymes that convert latent TGF- β into active TGF- β [53], a suppressor of macrophage activation.

In summary, our study demonstrates that activation of the kinin system by *L. chagasi* and *L. donovani* modulated inflammation and upregulated macrophage effector responses. Additional studies are required to determine if comparable changes in the kinin system can modulate innate and/or adaptive immunity in the more complex setting of *Leishmania* infection transmitted by sand-flies, the natural vector.

Acknowledgements

We wish to thank Carlos V.P. Barbosa for preparation of parasites for intravital microscopy experiments and FACS analysis, Angela Alves and Leila Faustino for technical assistance and Professor Y.S. Bakhle for constructive comments. This work was supported by CNPq/Universal, FAPERJ and by Volkswagen Stiftung.

References

[1] J.M. Ribeiro, Role of saliva in blood-feeding by arthropods, *Annu. Rev. Entomol.* 32 (1987) 463–478.

- [2] L.A. Rosenthal, F.S. Sutterwala, M.E. Kehrli, D.M. Mosser, *Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion, *Infect. Immun.* 64 (1996) 2206–2215.
- [3] M.E. Wilson, R.D. Pearson, Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes, *Infect. Immun.* 56 (1988) 363–369.
- [4] M. Dominguez, I. Moreno, M. Lopez-Trascasa, A. Torano, Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum, *J. Exp. Med.* 195 (2002) 451–459.
- [5] Y. Belkaid, S. Kamhawi, G. Modi, J. Valenzuela, N. Noben-Trauth, E. Rowton, J. Ribeiro, D.L. Sacks, Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis, *J. Exp. Med.* 188 (1998) 1941–1953.
- [6] R.B. Gomes, C. Brodskyn, C.I. De Oliveira, J. Costa, J.C. Miranda, A. Caldas, J.G. Valenzuela, M. Barral-Netto, A. Barral, Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity, *J. Infect. Dis.* 186 (2002) 1530–1534.
- [7] Y. Belkaid, J.G. Valenzuela, S. Kamhawi, E. Rowton, D.L. Sacks, J.M. Ribeiro, Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 6704–6709.
- [8] A.M. Bittencourt, Leishmaniasis, p. 597–651, in: S.G.D.W. (Ed.), *Tropical Pathology*, second ed, vol. 8, Springer, Berlin, 1995.
- [9] C.R. Engwerda, M. Ato, P.M. Kaye, Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis, *Trends Parasitol.* 20 (2004) 524–530.
- [10] P.M. Gorak, C.R. Engwerda, P.M. Kaye, Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection, *Eur. J. Immunol.* 28 (1998) 687–695.
- [11] S. Ahmed, M. Colmenares, L. Soong, K. Goldsmith-Pestana, L. Munstermann, R. Molina, D. McMahon-Pratt, Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis, *Infect. Immun.* 71 (2003) 401–410.
- [12] K.D. Bhoola, C.D. Figueroa, K. Worthy, Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases, *Pharmacol. Rev.* 44 (1992) 1–80.
- [13] J. Aliberti, J.P. Viola, A. Vieira-de-Abreu, P.T. Bozza, A. Sher, J. Scharfstein, Cutting edge: bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization, *J. Immunol.* 170 (2003) 5349–5353.
- [14] A. Kozik, R.B. Moore, J. Potempa, T. Imamura, M. Rapala-Kozik, J. Travis, A novel mechanism for bradykinin production at inflammatory sites. Diverse effects of a mixture of neutrophil elastase and mast cell tryptase versus tissue and plasma kallikreins on native and oxidized kininogens, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 33224–33229.
- [15] S.G. Farmer, R.M. Burch, Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32 (1992) 511–536.
- [16] F. Marcean, D.R. Bachvarov, Kinin receptors, *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 16 (1998) 385–401.
- [17] H. Herwald, M. Collin, W. Muller-Esterl, L. Bjorck, Streptococcal cysteine proteinase releases kinins: a virulence mechanism, *J. Exp. Med.* 184 (1996) 665–673.
- [18] H. Maeda, T. Yamamoto, Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 377 (1996) 217–226.
- [19] T. Imamura, R.N. Pike, J. Potempa, J. Travis, Pathogenesis of periodontitis: a major arginine-specific cysteine proteinase from *Porphyromonas gingivalis* induces vascular permeability enhancement through activation of the kallikrein/kinin pathway, *J. Clin. Invest.* 94 (1994) 361–367.
- [20] I. Rubinstein, J. Potempa, J. Travis, X.P. Gao, Mechanisms mediating *Porphyromonas gingivalis* gingipain RgpA-induced oral mucosa inflammation in vivo, *Infect. Immun.* 69 (2001) 1199–1201.

- [21] J. Scharfstein, V. Schmitz, V. Morandi, M.M. Capella, A.P. Lima, A. Morrot, L. Juliano, W. Muller-Esterl, Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 1289–1300.
- [22] E. Del Nery, M.A. Juliano, A.P. Lima, J. Scharfstein, L. Juliano, Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 25713–25718.
- [23] A.P. Lima, P.C. Almeida, I.L. Tersariol, V. Schmitz, A.H. Schmaier, L. Juliano, I.Y. Hirata, W. Muller-Esterl, J.R. Chagas, J. Scharfstein, Heparan sulfate modulates kinin release by *Trypanosoma cruzi* through the activity of cruzipain, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 5875–5881.
- [24] A.G. Todorov, D. Andrade, J.B. Pesquero, C. Araujo Rde, M. Bader, J. Stewart, L. Gera, W. Muller-Esterl, V. Morandi, R.C. Goldenberg, H.C. Neto, J. Scharfstein, *Trypanosoma cruzi* induces edematogenic responses in mice and invades cardiomyocytes and endothelial cells in vitro by activating distinct kinin receptor (B1/B2) subtypes, *FASEB J.* 17 (2003) 73–75.
- [25] G.F. Spath, S.M. Beverley, A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation, *Exp. Parasitol.* 99 (2001) 97–103.
- [26] E. Svensjö, F.Z. Cyrino, L. Juliano, J. Scharfstein, Plasma leakage induced in postcapillary venules by the major cysteine-proteinase from *Trypanosoma cruzi* and its modulation by H1-blocker mepyramine, *Microvasc. Res.* 54 (1997) 93–97.
- [27] E. Svensjö, Bradykinin and prostaglandin E1, E2 and F2alpha-induced macromolecular leakage in the hamster cheek pouch, *Prostaglandins Med.* 1 (1978) 397–410.
- [28] J.C. Engel, P.S. Doyle, I. Hsieh, J.H. McKerrow, Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection, *J. Exp. Med.* 188 (1998) 725–734.
- [29] J. Ferreira, M.M. Campos, R. Araujo, M. Bader, J.B. Pesquero, J.B. Calixto, The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level, *Neuropharmacology* 43 (2002) 1188–1197.
- [30] J. Kaufmann, M. Haasemann, S. Modrow, W. Muller-Esterl, Structural dissection of the multidomain kininogens. Fine mapping of the target epitopes of antibodies interfering with their functional properties, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 9079–9091.
- [31] H. Goto, J.A. Lindoso, Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37 (2004) 615–623.
- [32] E. Svensjö, The hamster cheek pouch as a model in microcirculation research, *Eur. Respir. J. (Suppl. 12)* (1990) 595s–600s (discussion 600s–601s).
- [33] N.J. Brown, D.E. Vaughan, Angiotensin-converting enzyme inhibitors, *Circulation* 97 (1998) 1411–1420.
- [34] C.M. Rao, P. Salotra, K. Datta, Possible role of the 34-kDa hyaluronic acid-binding protein in visceral Leishmaniasis, *J. Parasitol.* 85 (1999) 682–687.
- [35] J. Scharfstein, Activation of bradykinin-receptors by *Trypanosoma cruzi*: a role for cruzipain in microvascular pathology, in: J. Kelly (Ed.), *Molecular Mechanisms in the Pathogenesis of Chagas Disease*, Landes Bioscience, Austin, Texas, USA, 2003.
- [36] V. Mundodi, A. Somanna, P.J. Farrell, L. Gedamu, Genomic organization and functional expression of differentially regulated cysteine protease genes of *Leishmania donovani* complex, *Gene* 282 (2002) 257–265.
- [37] R. Ramamoorthy, J.E. Donelson, K.E. Paetz, M. Maybodi, S.C. Roberts, M.E. Wilson, 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.* 267 (1992) 1888–1895.
- [38] Z. Shariat-Madar, F. Mahdi, A.H. Schmaier, Mapping binding domains of kininogens on endothelial cell cyokeratin 1, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 7137–7145.
- [39] T. Renne, J. Dedio, G. David, W. Muller-Esterl, High molecular weight kininogen utilizes heparan sulfate proteoglycans for accumulation on endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 33688–33696.
- [40] A.A. Hasan, D.B. Cines, H. Herwald, A.H. Schmaier, W. Muller-Esterl, Mapping the cell binding site on high molecular weight kininogen domain 5, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 19256–19261.
- [41] M.D. Laurenti, C.E. Corbett, M.N. Sotto, I.L. Sinhorini, H. Goto, The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host–parasite interaction in hamsters inoculated with *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Int. J. Exp. Pathol.* 77 (1996) 15–24.
- [42] M.V. Lonardoní, M. Russo, S. Jancar, Essential role of platelet-activating factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection, *Infect. Immun.* 68 (2000) 6355–6361.
- [43] E. Svensjö, W.L. Joyner, The effects of intermittent and continuous stimulation of microvessels in the cheek pouch of hamsters with histamine and bradykinin on the development of venular leaky sites, *Microcirc. Endothelium Lymphatics* 1 (1984) 381–396.
- [44] S. Shigematsu, S. Ishida, D.C. Gute, R.J. Korthuis, Concentration-dependent effects of bradykinin on leukocyte recruitment and venular hemodynamics in rat mesentery, *Am. J. Physiol.* 277 (1999) H152–H160.
- [45] M. Erlansson, D. Bergqvist, N.H. Persson, E. Svensjö, Modification of postischemic increase of leukocyte adhesion and vascular permeability in the hamster by Iloprost, *Prostaglandins* 41 (1991) 157–168.
- [46] S. Shigematsu, S. Ishida, D.C. Gute, R.J. Korthuis, Bradykinin-induced proinflammatory signaling mechanisms, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283 (2002) H2676–H2686.
- [47] C. Matte, M. Olivier, *Leishmania*-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators, *J. Infect. Dis.* 185 (2002) 673–681.
- [48] P. Kropf, N. Freudenberg, C. Kalis, M. Modolell, S. Herath, C. Galanos, M. Freudenberg, I. Muller, Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNcr mice with *Leishmania major* reveals a role for Toll-like receptor 4 in the control of parasite replication, *J. Leukoc. Biol.* 76 (2004) 48–57.
- [49] J. Bjork, T.E. Hugli, G. Smedegard, Microvascular effects of anaphylatoxins C3a and C5a, *J. Immunol.* 134 (1985) 1115–1119.
- [50] J.C. Mottram, D.R. Brooks, G.H. Coombs, Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host–parasite interactions, *Curr. Opin. Microbiol.* 1 (1998) 455–460.
- [51] J. Friedland, C. Setton, E. Silverstein, Induction of angiotensin converting enzyme in human monocytes in culture, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83 (1978) 843–849.
- [52] J.M. Blackwell, R.A. Ezekowitz, M.B. Roberts, J.Y. Channon, R.B. Sim, S. Gordon, Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum, *J. Exp. Med.* 162 (1985) 324–331.
- [53] K.R. Gantt, S. Schultz-Cherry, N. Rodriguez, S.M. Jeronimo, E.T. Nascimento, T.L. Goldman, T.J. Recker, M.A. Miller, M.E. Wilson, Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages, *J. Immunol.* 170 (2003) 2613–2620.