

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Caracterização do polimorfismo intraespecífico do lipofosfoglicano (LPG)
de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 e seu papel na interação com
***Lutzomyia longipalpis* e macrófagos murinos**

por

Junara Miranda Coelho Finamore

Belo Horizonte
Dezembro/2010

DISSERTAÇÃO MBCM - CPqRR J.M.C.FINAMORE 2010

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Caracterização do polimorfismo intraespecífico do lipofosfoglicano (LPG)
de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 e seu papel na interação com
Lutzomyia longipalpis e macrófagos murinos**

por

Junara Miranda Coelho Finamore

**Dissertação apresentada com vistas à obtenção
do Título de Mestre em Ciências na área de
concentração Biologia Celular e Molecular.**

Orientação: Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares

Belo Horizonte

Dezembro/2010

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

F491c Finamore, Junara Miranda Coelho.

2010

Caracterização do polimorfismo intraespecífico do lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 e seu papel na interação com *Lutzomyia longipalpis* e macrófagos murinos/ Junara Miranda Coelho Finamore. – Belo Horizonte, 2010.

xvii, 92 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 102 - 108

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Leishmaniose/transmissão 2. *Leishmania infantum*/parasitologia 3. Glicoconjugados/genética I. Título. II. Soares, Rodrigo Pedro Pinto (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Caracterização do polimorfismo intraespecífico do lipofosfoglicano (LPG) de
Leishmania infantum Nicolle, 1908 e seu papel na interação com *Lutzomyia longipalpis* e
macrófagos murinos**

por

Junara Miranda Coelho Finamore

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares (Presidente)

Prof. Dra. Andrea Teixeira de Carvalho

Prof. Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo

Suplente: Prof. Dra. Silvane Maria F. Murta

Dissertação defendida e aprovada em: 10/12/2010

Colaboradores

Centro de Pesquisas René Rachou-Fundação Oswaldo Cruz (CPqRR – Fiocruz)

Dra. Nágila Francinete Costa Secundino

Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta

Dra. Vanessa Cabreira de Freitas

Ms. Rafael Ramiro de Assis

Universidade Federal de Minas Gerais

Dra. Maria Norma Melo

Departamento de Bioquímica/Universidade do Kentucky

Dr. Salvatore Joseph Turco

Dra. Natasha Novozhilova

Suporte Financeiro

Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- nº (305008/2007-2, 472699/2007-5 e 471465/2009-7)

TDR-WHO (ID A50880)

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG APQ-3726-4.01/07)

Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ

Dedico esta conquista

*Ao meu mestre e amigo Jesus Cristo por me
impulsionar na busca de meus objetivos.*

*À minha preciosa família, pelo amor e por me
apoiarem em todas as decisões.*

Aos verdadeiros amigos que conquistei nesta jornada.

Agradecimentos

Agradeço a DEUS pelo Seu imenso amor e pela presença constante em minha vida, por compreender minhas limitações e me fortalecer na busca de cada um dos meus objetivos. Enfim, por colocar em meu caminho pessoas tão especiais com as quais gostaria de compartilhar mais uma vitória alcançada.

Aos meus amados pais agradeço pelo amor, exemplo, dedicação e absoluta confiança, por sempre me apoiarem e me fazerem acreditar que eu seria capaz de vencer qualquer obstáculo.

Ao meu esposo pelo amor e paciência incondicional diante de constantes momentos de ausência. Pelas palavras de carinho e incentivo e por apoiar cada uma das minhas decisões.

Ao meu orientador e amigo Dr. Rodrigo Soares por me proporcionar uma experiência que vai além do aspecto científico e, assim, me fazer crescer tanto profissional quanto pessoalmente.

Agradeço aos colaboradores deste trabalho, em especial àqueles que também se tornam amigos, Ms. Rafael Ramiro e Dra. Natasha por auxiliar nos experimentos nos EUA; Dra. Vanessa Freitas pela colaboração nos experimentos com flebotomíneos; Dra. Maria Norma pelo exemplo, carinho e por fornecer várias cepas utilizadas neste estudo; ao Dr. Sam Turco pelo excelente referencial teórico e por disponibilizar seu laboratório para realização de algumas técnicas e para possíveis colaborações futuras.

Ao Laboratório de Entomologia Médica (LEM) na pessoa do Dr. Paulo Pimenta e Dra. Nágila Secundino por fornecer toda a infraestrutura necessária para a realização deste trabalho e, em especial, pela colaboração nos ensaios com flebotomíneos.

Aos amigos do grupo de Glicobiologia- Rafael, Marcele, Vanessa, Paula, Izabela, Felipe e Igor - agradeço pelo auxílio constante na realização de meu trabalho e também pelos momentos de descontração após o expediente. A todos os amigos do LEM, em especial, Fernanda Gambogi e Ana Carolina Anhê agradeço pelo carinho, apoio e confiança.

Agradeço a biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou na pessoa do Diretor Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira agradeço pelo suporte oferecido por meio de diferentes setores e profissionais da instituição que garantiram a qualidade de meu trabalho.

Agradeço, por fim, ao apoio financeiro concedido por CNPq, TDR e FAPEMIG.

Sumário

Lista de figuras -----	XI
Lista de tabelas -----	XIII
Lista de abreviaturas e símbolos -----	XIV
Resumo -----	XVI
Abstract -----	XVII
1 INTRODUÇÃO _____	18
2 OBJETIVOS _____	19
2.1 Objetivo geral-----	19
2.2 Objetivos específicos-----	19
3 REVISÃO DE LITERATURA _____	20
4 METODOLOGIA _____	31
4.1 Cultivo Celular-----	31
4.2 Extração do LPG-----	33
4.3 Purificação do LPG-----	33
4.4 Dosagem do LPG-----	34
4.5 Análise por Western blot-----	34
4.6 Preparo das unidades repetitivas-----	35
4.6.1 Despolimerização do LPG-----	35
4.6.2 Tratamento enzimático-----	37
4.7 Eletroforese de carboidratos-----	37
4.8 Eletroforese Capilar (CE)-----	38
4.9 Eletroforese de monossacarídeos-----	38
4.10 Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)-----	39
4.11 Análise da produção de Óxido Nítrico (NO)-----	40

4.12	Análise da densidade de parasitos de diferentes cepas de <i>L. infantum</i> no intestino de <i>L. longipalpis</i> -----	41
4.12.1	Captura e acondicionamento dos flebotomíneos-----	41
4.13	Infecção experimental dos flebotomíneos por meio de alimentação artificial-----	41
4.13.1	Preparo do sangue com os parasitos-----	41
4.13.2	Separação dos flebotomíneos-----	42
4.13.3	Alimentação artificial-----	42
4.13.4	Manutenção dos flebotomíneos infectados-----	43
4.14	Dissecção e análise do processo de infecção dos flebotomíneos-----	43
4.15	Análise Estatística-----	44
5	RESULTADOS -----	45
5.1	Purificação do LPG-----	45
5.2	Análise do perfil eletroforético das unidades repetitivas -----	47
5.3	Eletroforese capilar das unidades repetitivas do LPG-----	50
5.4	Análise do perfil eletroforético dos monossacarídeos-----	53
5.5	Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)-----	54
5.6	Análise da produção de óxido nítrico (NO)-----	57
5.7	Análise da infecção de <i>Lutzomyia longipalpis</i> -----	59
6	DISCUSSÃO -----	60
7	CONCLUSÕES -----	66
8	ANEXO -----	67
8.1	Artigo final: Coelho-Finamore JM, Freitas VC, Assis RR, Melo MN, Novozhilova N, Secundino NF, <i>et al.</i> <i>Leishmania infantum</i> : Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. Int J Parasitol 2011; 41(3-4):333-42-----	67
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	102

Lista de figuras

Figura 1: Representação do ciclo de vida de <i>Leishmania spp</i> -----	20
Figura 2: Representação esquemática dos glicoconjugados de <i>Leishmania</i> -----	25
Figura 3: Desenho esquemático da estrutura do LPG-----	25
Figura 4: Diagrama esquemático da estrutura do LPG das formas procíclica (P-LPG) e metacíclica (M-LPG) de <i>L. major</i> -----	27
Figura 5: Diagrama esquemático da estrutura do LPG de <i>L. donovani</i> e <i>L. tropica</i> -----	27
Figura 6: Via de sinalização Toll dependente da proteína adaptadora MyD88-----	29
Figura 7: Esquema de fracionamento do LPG-----	36
Figura 8: Esquema do processo de alimentação artificial-----	43
Figura 9: Western-blot de LPG purificado-----	46
Figura 10: Perfis eletroforéticos das unidades repetitivas do LPG das diferentes cepas de <i>L. infantum</i> -----	48
Figura 11: Perfil eletroforético das unidades repetitivas do LPG de <i>L. infantum</i> (cepa 268) antes e após o tratamento com β -galactosidase-----	49
Figura 12: Perfis eletroforéticos das unidades repetitivas do LPG de <i>L. infantum</i> submetidas à eletroforese capilar-----	51
Figura 13: Perfis eletroforéticos dos monossacarídeos das unidades repetitivas do LPG de <i>L. donovani</i> 1S-2D (controle) e <i>L. infantum</i> (EMO e BH46)-----	53
Figura 14: Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) de monossacarídeos do LPG de <i>L. donovani</i> -----	55

Figura 15: Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) de monossacarídeos do LPG de <i>L. infantum</i> (cepas EMO e BH46) -----	56
Figura 16: Produção de nitrito por macrófagos murinos estimulados por promastigotas de diferentes cepas de <i>L. infantum</i> e seus respectivos LPGs -----	58
Figura 17: Densidade de parasitos no intestino médio de <i>L. longipalpis</i> artificialmente alimentado com <i>L. infantum</i> (cepas Ba262, EMO, IPT1, PP75 e BH46) -----	59
Figura 18: Distribuição geográfica das cepas de <i>L. infantum</i> utilizadas -----	62
Figura 19: Diagrama esquemático dos três tipos de LPG observados entre as diferentes cepas de <i>L. infantum</i> analisadas.-----	63

Lista de tabelas

Tabela 1: Cepas de <i>L. infantum</i> analisadas.-----	32
Tabela 2: Soluções para o preparo dos géis de resolução e concentração (poliacrilamida 12%).----	34
Tabela 3: Soluções para o preparo dos géis de resolução e concentração utilizados na eletroforese de carboidratos.-----	38
Tabela 4: Soluções para o preparo dos géis de resolução e concentração utilizados na eletroforese de monossacarídeos.-----	39
Tabela 5: Tipos de LPG observados nas cepas de <i>Leishmania infantum</i> analisadas. -----	52

Lista de abreviaturas e símbolos

% - Porcentagem

μL- microlitros

°C- grau Celsius

AMAC- 2-aminoacridone

ANTS- 8-aminoftaleno-1, 3, 6 trissulfato

APS- Persulfato de amônio

APTS- 8-aminopireno-1, 3, 6- ácido trissulfônico

CDC- Center for Diseases Control (Centro de Controle de Doenças)

CE- Eletroforese Capilar

DMSO- Dimetilsulfóxido

FIOCRUZ- Fundação Osvaldo Cruz

Gal- Galactose

GIPL- Glicoinositolfosfolípide

Glc- Glicose

GlcN- N-acetil glicosamina

GPI- Glicosilfosfatidilinositol

HPLC- Cromatografia líquida de alta performance

IFN-γ- Interferon gama

LC- Leishmaniose cutânea

LEM- Laboratório de Entomologia Médica

LMC- Leishmaniose mucocutânea

LPS- Lipopolissacarídeo

LPG- Lipofosfoglicano

LV- Leishmaniose visceral

Man – Manose

mL- mililitro

MLEE- Multi-Locus Enzyme Electrophoresis (Eletroforese de enzimas)

MLMT- Multilocus microsatellite typing (tipagem por microsatélite)

MP- Matriz Peritrófica

nm- nanômetro

PBS- Phosphate Buffer Saline (tampão fosfato/ salina)

PCR- Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)

PGs- Fosfoglicanos

PPGs- Proteofosfoglicanos

RAPD- Random Amplification of Polymorphic DNA (amplificação randômica de DNA polimórfico)

RFLP- Restriction fragment length polymorphism (polimorfismo entre fragmentos de restrição)

RPMI- Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura)

sAP- Fosfatase ácida secretada

SFB- Soro fetal bovino

TLR- Toll like receptor (receptor tipo Toll)

Resumo

O LPG é o principal glicoconjugado da superfície de *Leishmania* sendo constituído por quatro domínios: (I) uma âncora lipídica de 1-*O*-alquil-2-*liso*-fosfatidilinositol, (II) uma parte central formada por um heptassacarídeo Gal(α 1,6)Gal(α 1,3)Gal(β 1,3)[Glc(α 1)-PO₄]Man(α 1,3)Man(α 1,4)-GlcN(α 1), (III) uma região de unidades repetitivas fosforiladas Gal(β 1,4)Man(α 1)-PO₄ e (IV) um oligossacarídeo terminal ("cap"). As variações na seqüência e composição de açúcares ligados às unidades repetitivas e ao cap atribuem polimorfismos à molécula de LPG. O polimorfismo interespecífico do LPG tem sido amplamente estudado para espécies do Velho e do Novo Mundo e demonstra implicações na especificidade da interação parasito-vetor. Entretanto, pouco se sabe sobre a variabilidade intraespecífica da molécula de LPG. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar o grau de polimorfismo das unidades repetitivas do LPG de 16 cepas de *Leishmania infantum* do Brasil, França, Tunísia e Algéria. Além disso, o papel deste polimorfismo foi avaliado durante a interação *in vivo* de *L. infantum* com *Lutzomyia longipalpis* e na interação *in vitro* dos parasitos e seus respectivos LPGs com macrófagos murinos. O polimorfismo das unidades repetitivas do LPG de *L. infantum* foi considerado relativamente baixo e, de acordo com suas modificações, o LPG foi classificado em três tipos: tipo I, LPG cujas unidades repetitivas não apresentam cadeias laterais; tipo II, LPG cujas unidades repetitivas apresentam cadeias laterais contendo um resíduo de β -glicose e, tipo III, LPG cujas unidades repetitivas apresentam cadeias laterais contendo até três resíduos de glicose. Essas variações no LPG não afetaram a densidade de parasitos no intestino do vetor. No entanto, foi observada uma tendência à maior produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos estimulados por LPGs glicosilados do tipo II. Juntos, os resultados obtidos neste trabalho indicam que o polimorfismo intraespecífico do LPG de *L. infantum* não tem efeito sobre a interação do parasito com seu vetor, mas exerce papel regulatório sobre a produção de NO. A caracterização de todos estes LPGs, realizada pela primeira vez com uma ferramenta bioquímica, confirma os dados de estudos moleculares anteriores e nos permitem considerar que *L. chagasi* e *L. infantum* são a mesma espécie.

Abstract

LPG is the major surface glycoconjugate of *Leishmania* having four domains: (I) a phosphatidylinositol lipid anchor, (II) a phosphosaccharide core, (III) a repeating phosphorylated saccharide region and (IV) a small oligosaccharide cap structure. Variations in the composition and sequence of sugars that branch off the repeat units and the oligosaccharide cap ascribe polymorphism to LPG. The LPG interspecific polymorphisms have been studied to *Leishmania* species from Old and New World and they have been implicated in the specificity of interaction parasite-vector. However, it is still unknown the level of polymorphism in this moiety in a given species from different regions. In this study, it was evaluated the intraspecific variation in the repeat units of LPG in 16 strains of *L. infantum* from Brazil, France, Tunisia and Algeria. Moreover, the significance of these modifications was investigated during in vivo interaction of *L. infantum* with *Lutzomyia longipalpis* and, in vitro interaction of the parasites and respective LPGs with murine macrophages. The structural polymorphism in the *L. infantum* LPG repeat units was relatively slight and consisted of three types: Type I, which does not have side chains; type II, having one β -glucose residues that branch off the disaccharide-phosphate repeat units and, type III, having up to three glucose residues (oligo-glucosylated). There were no consequential differences in the parasite densities in the sand fly midgut infected with *Leishmania* strains exhibiting types I, II and III LPGs. However, a higher nitric oxide (NO) production was observed in murine macrophages exposed to glucosylated type II LPG. In conclusion, the polymorphism observed in the *L. infantum* LPG has no effect in interaction with the invertebrate host, but has a differential effect in the NO synthesis by murine macrophages. Our biochemical data are in agreement with previous molecular studies considering that *L. infantum* and *L. chagasi* are the same species.

1 Introdução

As leishmanioses são um grave problema de saúde pública devido ao aumento no número de casos registrados a cada ano e a mudança no padrão de distribuição da doença. Embora originalmente rurais, as leishmanioses se encontram em franca expansão atingindo os grandes centros urbanos. As dificuldades no controle de reservatórios e vetores, a ineficácia dos tratamentos devido ao desenvolvimento de cepas de *Leishmania* resistentes e a inexistência de vacinas humanas são fatores que contribuem para a expansão da doença.

Estudos que auxiliem a compreensão dos mecanismos de interação de *Leishmania* com seus hospedeiros constituem uma ferramenta importante no entendimento da biologia deste parasito. Desta forma, a variabilidade genética em *Leishmania* tem sido alvo de um grande número de estudos que buscam identificar marcadores de virulência e correlacioná-los com a imunopatologia da doença.

Um fator de virulência importante, o lipofosfoglicano (LPG), é o glicoconjugado majoritário da superfície de *Leishmania*. Esta molécula está envolvida em uma série de eventos que permitem a sobrevivência e o desenvolvimento dos parasitos dentro do trato intestinal de seus vetores bem como nas células do hospedeiro vertebrado.

Os polimorfismos interespecíficos na molécula de LPG conferem especificidade na interação entre os parasitos e seus vetores e atuam na regulação da produção de importantes moléculas efetoras do sistema imune do hospedeiro vertebrado.

Entretanto, a variabilidade intraespecífica desta molécula e suas implicações na relação parasito/hospedeiro são pouco conhecidas. Como parte de um amplo estudo que pretende caracterizar moléculas glicosiladas de espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o LPG de diferentes cepas de *L. infantum* do Brasil, da Europa e da África e avaliar o seu papel na interação do parasito com o vetor e com os macrófagos murinos.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o grau de polimorfismo intraespecífico nas unidades repetitivas do LPG de *L. infantum* e o seu papel na interação com *L. longipalpis* e com macrófagos murinos.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair, purificar e caracterizar as unidades repetitivas do LPG das diferentes cepas de *L. infantum*;
- Avaliar a produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos murinos estimulados por cepas de *L. infantum* e seus respectivos LPGs;
- Avaliar a densidade de parasitos no intestino médio de *L. longipalpis* infectado com as diferentes cepas de *L. infantum*.

3 Revisão de literatura

As leishmanioses são doenças de amplo espectro clínico e epidemiológico dependendo da espécie do parasito, vetor e hospedeiro envolvidos. O agente etiológico é um protozoário do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), que é transmitido ao homem e a outros hospedeiros pela picada de fêmeas de flebotomíneos (Psychodidae: Phlebotominae) (Killick-Kendrick, 1990). O ciclo de transmissão pode ser antroponótico quando o homem é o principal reservatório, como na Índia, ou zoonótico quando animais assumem tal função (Desjeux, 2001). Seu ciclo de vida é do tipo digenético, alternando-se entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. As formas amastigotas são encontradas no interior de células do sistema monocítico fagocitário, enquanto as formas promastigotas se desenvolvem dentro do vetor (Bates, 2004) (FIG. 1).

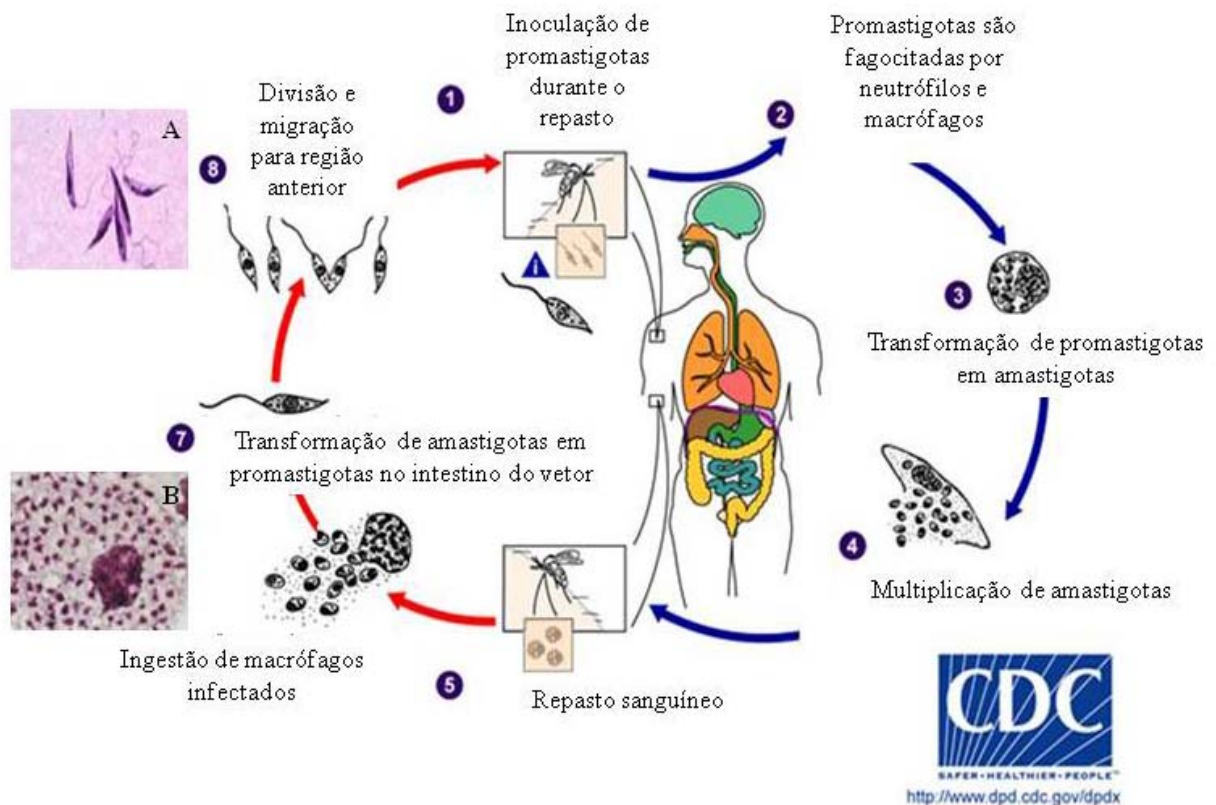


Figura 1: Representação do ciclo de vida de *Leishmania* spp. (Adaptado do site CDC) (A); formas promastigotas (B) e amastigota (C) do parasito.

A doença afeta cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, das quais 500 mil desenvolvem a forma visceral e 1,5 milhões a forma tegumentar a cada ano. Entretanto, este número pode ser subestimado, uma vez que as leishmanioses são doenças de notificação obrigatória somente em 40 dos 88 países em que ocorrem (WHO, 2004). Cerca de 350 milhões de pessoas vivem na área de distribuição das leishmanioses, tanto no Novo quanto no Velho Mundo (Matlashewski, 2001; Desjeux, 2004).

Existem três tipos básicos da doença: leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV) (Cunningham, 2002). No Novo Mundo, a LC caracteriza-se por lesões que podem curar-se espontaneamente e são causadas pelas espécies do complexo “*Leishmania mexicana*” como *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) venezuelensis* e por espécies do sub-gênero *Viannia*, incluindo *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) peruviana*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) shawi* e *Leishmania (V.) naiffi*. No Velho Mundo, a LC é causada principalmente por *Leishmania (L.) major* e *Leishmania (L.) tropica*. As LMCs, que manifestam-se como lesões desfigurantes nas mucosas oral, nasal e da faringe, são causadas principalmente por *L. (V.) braziliensis* e em menor grau por *L. (V.) panamensis*. A LV, manifestação mais grave da doença, caracteriza-se por sinais sistêmicos como febre, perda de peso, hepatomegalia e esplenomegalia, levando a morte do paciente em mais de 90% dos casos quando não tratada. É causada pelas espécies *Leishmania (L.) donovani*, e *Leishmania (L.) infantum* (syn. *Leishmania (L.) chagasi*) que atingem principalmente a Índia, Bangladesh, Sudão, Etiópia, Kenya e Brasil, países responsáveis por 90% dos casos da doença (Herwaldt, 1999; Ashford, 2000; Matlashewski 2001; Davidson, 2005).

Os métodos diagnósticos atualmente disponíveis baseiam-se principalmente na detecção de parasitos (esfregaços corados, cultura e histopatologia) e em métodos imunológicos para a avaliação da resposta celular (leishmaniose tegumentar) ou humoral (leishmaniose visceral). Além disto, o uso de métodos moleculares como a PCR tem se mostrado bastante útil para o diagnóstico e tipagem das *leishmanias*, possuindo alta sensibilidade e especificidade (Mimori *et al.*, 1998; Marques *et al.*, 2006; Singh, 2006; Rocha *et al.*, 2010).

O tratamento das leishmanioses humanas é realizado com o uso de antimoniais pentavalentes: antimoniato de N-metil meglumina – Glucantime^R e estibogluconato de sódio - Pentostan^R que, no Brasil, constituem os fármacos de primeira escolha (Gontijo, 2004). Na Índia, devido ao aparecimento de cepas resistentes ao Glucantime, a droga de primeira

escolha é a Anfotericina B (Singh, 2004). No entanto, a toxicidade, a baixa eficácia, e a resistência a esses fármacos têm impulsionado o estudo de novas formulações e mesmo de novos compostos. Atualmente, outras drogas estão disponíveis para o tratamento da LV como é o caso da paromomicina e da miltefosina oral (Moore, 2010). Outros fatores como a co-infecção com HIV podem também levar a falhas terapêuticas (Pintado *et al.*, 2001).

Vacinas contra a LV canina encontram-se ainda em desenvolvimento. Atualmente, existem duas vacinas em uso no mercado: a Leishmune®, desenvolvida pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (Borja-Cabrera *et al.*, 2002) e a Leishtec®, recentemente desenvolvida por grupo da Universidade Federal de Minas Gerais (Fernandes *et al.*, 2008). Embora tenham conferido níveis de proteção promissores, estas vacinas ainda carecem de mais estudos no campo (Fase III e IV) para real determinação de sua eficácia.

Além do diagnóstico e tratamento de casos humanos, o controle de vetores é outra medida adotada no controle das leishmanioses. Tal medida envolve as mais variadas formas de utilização de inseticidas (aplicações dentro ou fora dos domicílios, uso de coleiras repelentes) e é direcionada ao controle de adultos, já que as formas imaturas do inseto são dificilmente encontradas. No entanto, essa medida tem se tornado cada vez mais limitada devido à necessidade de equipamentos e treinamentos adequados para uma utilização em larga escala (Alexander, 2003).

A taxonomia do gênero *Leishmania* tem sido alvo de intensa investigação, especialmente nas Américas, onde a origem do agente etiológico da LV é controversa e divide opiniões entre uma origem nativa dos parasitos ou a importação desses. A eletroforese de isoenzimas (MLEE), padrão ouro para a caracterização de isolados de *Leishmania*, permitiu a identificação de diferentes zimodemas neste gênero bem como o estabelecimento de relações filogenéticas (Cupolillo, 1994; 1998). Com o advento de novas ferramentas moleculares como microsátélites, RFLP e RAPD, Maurício e colaboradores (2000) propuseram que *L. chagasi* e *L. infantum* seriam a mesma espécie. Outros trabalhos propuseram dentro do complexo *L. donovani* que essa espécie e *L. archibaldi* seriam a mesma. Finalmente, após amplas análises moleculares (Lukes *et al.*, 2007), foi sugerida uma nova descrição taxonômica onde apenas *L. infantum* e *L. donovani* fossem consideradas membros desse complexo. No nosso trabalho, consideraremos todas as cepas utilizadas como *L. infantum*.

Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) é o principal vetor para o agente etiológico da LV na América Latina (Grimaldi, 1989), enquanto na região mediterrânea esta doença é transmitida principalmente por *Phlebotomus perniciosus* (Ready, 2010). No ambiente urbano, o cão tem sido implicado como o principal hospedeiro e fonte de infecção para o vetor (Gontijo, 2004). Outros hospedeiros vertebrados também incluem mamíferos

silvestres e domésticos. Alguns mamíferos não domésticos que foram encontrados naturalmente infectados com *Leishmania* como *Rattus rattus* e *Didelphis albiventris* são considerados animais sinantrópicos. Este processo de domiciliação é importante para o estabelecimento de novos padrões epidemiológicos da LV (Dantas-Torres, Brandão-Filho, 2006).

A distribuição geográfica da LV tem se transformado ao longo das últimas décadas, sobretudo no Brasil, deixando de ser exclusivamente rural para atingir também os centros urbanos (Rotureau, 2006). Tal transformação pode ser atribuída principalmente à capacidade adaptativa do vetor e, em menor extensão, à diversidade epidemiológica dos distritos afetados e aos casos de co-infecção por HIV (Oliveira, 2008; Herwaldt, 1999).

Durante o ciclo biológico de *Leishmania* no vetor, o parasito deve ser capaz de sobreviver em diferentes compartimentos e situações. Dependendo do subgênero de *Leishmania* (*Viannia* ou *Leishmania*) esta localização pode se alterar. O interior do tubo digestivo do flebotomíneo se divide em três partes: anterior, médio e posterior. As espécies do subgênero *Leishmania* apresentam desenvolvimento suprapilário, no qual os parasitos se desenvolvem principalmente no intestino médio antes de migrarem para a porção anterior. Já no subgênero *Viannia*, o desenvolvimento é peripilário, com a colonização do intestino posterior e subsequente migração dos parasitos para a região anterior (Laison & Shaw, 1987). Além disso, os parasitos sobrevivem sob condições adversas como à ação de enzimas digestivas no trato intestinal do vetor (Borovsky, 1987).

Após o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, as formas amastigotas ingeridas junto com o sangue são envolvidas pela matriz peritrófica (MP), que é constituída de proteínas, glicoproteínas e quitina. Esta estrutura protege o epitélio intestinal de partículas alimentares abrasivas e, ao mesmo tempo, permite a diferenciação dos parasitos em formas flageladas promastigotas que são mais resistentes à ação das enzimas digestivas (Pimenta *et al.*, 1997, Kamhawi, 2006). Estas, ao longo do trato digestivo, assumem diferentes formas que incluem: promastigotas procíclicas, nectomonadas, haptomonadas, leptomonadas e promastigotas metacíclicas, segundo nomenclatura proposta por Lawyer e colaboradores (1990). Cada um desses morfotipos exerce determinada função como no caso das nectomonadas que escapam da MP e aderem-se ao epitélio intestinal, impedindo sua eliminação durante a excreção do sangue digerido. As formas promastigotas metacíclicas se desligam do epitélio intestinal e migram em direção a porção anterior do intestino de onde poderão ser transmitidas ao hospedeiro vertebrado durante um novo repasto sanguíneo (Bates, 2004).

No hospedeiro vertebrado, os parasitos são expostos a condições hostis como a atividade lítica de componentes do complemento e diferentes mecanismos microbicidas das células efectoras. Inicialmente, os parasitos podem ser fagocitados e eliminados por neutrófilos, que são as primeiras células recrutadas para o sítio da infecção. A seguir, os macrófagos são recrutados e também assumem importante papel na eliminação dos parasitos.

A sobrevivência e multiplicação desses parasitos dependem de alguns mecanismos de evasão do sistema imune. Assim, já foi observado um fenômeno denominado “cavalo de Tróia” no qual *Leishmania* é capaz de modular importantes funções ao ponto de utilizar neutrófilos apoptóticos como veiculação para entrada silenciosa em macrófagos. (Laskay, 2003). Recentemente, foi observado outro mecanismo no qual os parasitos escapam dos neutrófilos apoptóticos antes de infectarem os macrófagos (Peters *et al.*, 2008; Ritter, 2009).

Depois de fagocitados por macrófagos, os parasitos são internalizados em um vacúolo onde se diferenciam em formas amastigotas multiplicando-se por divisão binária. Nestes processos, os parasitos sobrevivem à lise mediada pelo complemento e à explosão oxidativa (Descoteaux, 1999). Para tanto, utilizam-se de alguns mecanismos de escape que envolvem a participação de glicoconjugados ancorados à sua membrana ou secretados por eles (Sacks & Kamhawi, 2006; Turco, 2003).

Os glicoconjugados de superfície incluem o lipofosfoglicano (LPG), os glicoinositolfosfolípides (GIPLs) e as proteases de superfície (GP63) que são ancorados por glicosilfosfatidilinositol (GPI). A âncora de GPI é composta por uma porção glicídica contendo 6-7 oligossacarídeos ligados a uma porção lipídica contendo 1-*O*-alquil-2-*liso*-fosfatidilinositol (Turco, 1992). Além disso, os glicoconjugados podem ser secretados sob a forma de fosfatases ácidas (SAP), fosfoglicanos (PGs) e proteofosfoglicanos (PPGs) (Turco, 2003) (FIG. 2).

A análise estrutural do LPG tem revelado uma conservação completa da âncora lipídica, do heptassacarídeo e da região de unidades repetitivas. No entanto, modificações na estrutura básica do LPG têm sido observadas quando se comparam formas procíclicas e metacíclicas do parasito, destacando-se o aumento do número de unidades repetitivas. Além disto, a variabilidade na composição e seqüência de açúcares ligados às unidades repetitivas e ao cap confere polimorfismo à molécula de LPG de diferentes formas e espécies de *Leishmania* (Turco, 2003).

O polimorfismo interespecífico do LPG de *Leishmania* tem sido frequentemente observado. O primeiro LPG caracterizado foi o de *L. major*, o qual apresenta resíduos de β -galactose ocasionalmente substituídos por arabinose em suas unidades repetitivas (McConville *et al.*, 1990) (FIG. 4). Posteriormente, foram identificados os LPGs de *L. mexicana*, que possui cadeias laterais contendo resíduos de β -glicose (Ilg *et al.*, 1992) e o de *L. tropica*, exibindo pelo menos 19 tipos de combinações de açúcares ligados às unidades repetitivas (McConville *et al.*, 1995) (FIG. 5). Todos estes LPGs foram de espécies de *Leishmania* que causam leishmanioses tegumentares. O primeiro LPG de uma espécie viscerotrópica descrito foi o de *L. donovani* (Sudão), o qual não apresentou substituições em suas unidades repetitivas (Sacks *et al.*, 1995) (FIG. 5) e da Índia, o qual apresentou 1 ou 2 cadeias laterais contendo resíduos de β -glicose (Mahoney *et al.*, 1999).

Todos estes trabalhos, com exceção de *L. mexicana*, estudaram preferencialmente espécies do Velho Mundo. Recentemente, mais espécies de *Leishmania* do Novo Mundo começaram a ter seus LPGs caracterizados. O primeiro deles foi a cepa PP75 de *L. infantum* (Soares *et al.*, 2002), que apresenta resíduos de β -glicose nas unidades repetitivas e no cap. Em seguida, o LPG de *L. braziliensis* (cepa M2903), que não apresenta cadeias laterais nas formas procíclicas, mas possui unidades repetitivas com resíduos de β -glicose nas formas metacíclicas (Soares *et al.*, 2005). O principal efeito destes polimorfismos foi correlacionado com a especificidade destas espécies por seus vetores durante a interação parasito-hospedeiro invertebrado (Pimenta *et al.*, 1992; 1994; Soares *et al.*, 2002; 2004; 2010).

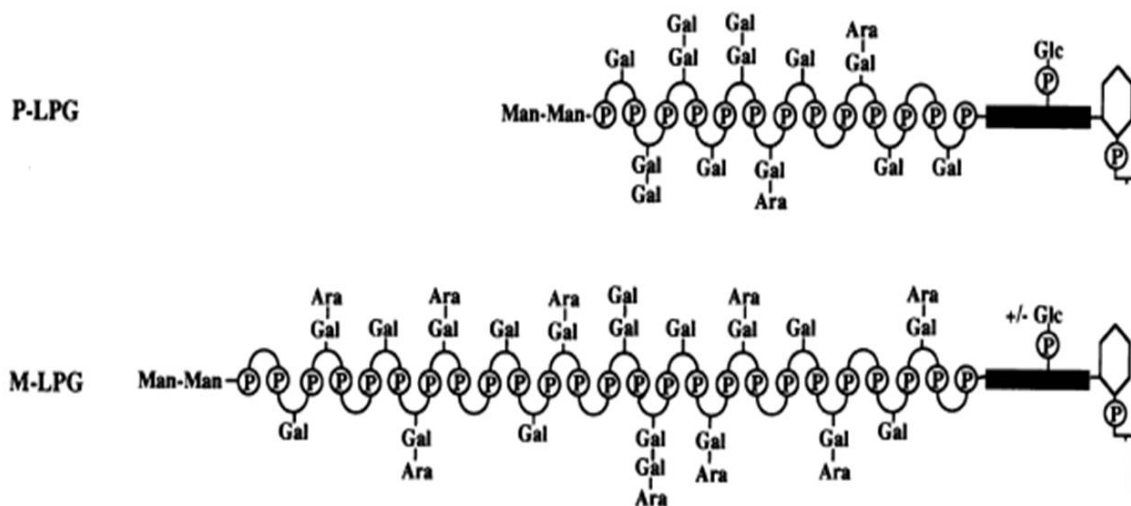


Figura 4: Diagrama esquemático da estrutura do LPG das formas procíclica (P-LPG) e metacíclica (M-LPG) de *L. major*. Glc = glicose, Gal = galactose, Man = manose, Ara = Arabinose, (P) = Fosfato

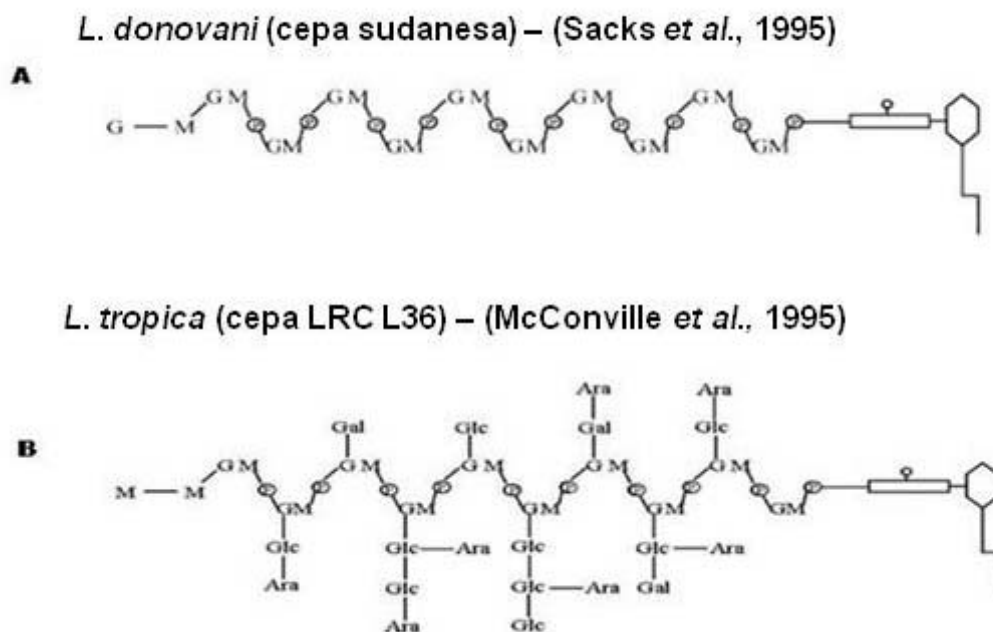


Figura 5: Diagrama esquemático da estrutura do LPG de *L. donovani* e *L. tropica*. Glc = glicose, G = galactose, M = manose, Ara = Arabinose, (P) = Fosfato

Modificações quantitativas na estrutura do LPG ocorrem durante a metaciclologênese, quando o parasito se diferencia de uma forma não infectante (promastigota procíclica) para uma forma infectante (promastigota metacíclica). Durante esse processo, a molécula de LPG dobra de tamanho devido ao aumento do número de unidades repetitivas. Mudanças qualitativas nas unidades repetitivas também ocorrem como no LPG de *L. major* no qual os resíduos de galactose são substituídos por arabinose nas formas metacíclicas (McConville *et al.*, 1992; Sacks *et al.*, 1995; Turco, 2003) (FIG. 4).

O uso de cepas mutantes em LPG tem permitido a identificação de um importante papel desta molécula durante a interação do parasito com seu vetor. Embora não seja considerado essencial em estágios iniciais da infecção, em estágios tardios, o LPG exerce um importante papel na resistência dos parasitos à ação de enzimas digestivas. Além disso, após a liberação do bolo fecal, tais moléculas auxiliam na manutenção dos parasitos ao permitir sua adesão ao epitélio intestinal do vetor (Sacks *et al.*, 1995; Butcher *et al.*, 1996).

A competência vetorial destes insetos para a transmissão de diferentes espécies de *Leishmania* parece ser controlada por polimorfismos interespecíficos na estrutura do LPG. *Phlebotomus papatasi* e *Phlebotomus sergenti* permitem apenas o desenvolvimento de *L. major* (Pimenta *et al.*, 1992) e *L. tropica* (Kamhawi *et al.*, 2000), respectivamente. Ao contrário, *Phlebotomus argentipes* (Pimenta *et al.*, 1994) e *L. longipalpis* (revisado em Soares, 2003) permitem o desenvolvimento de várias espécies de *Leishmania*. O desenvolvimento exclusivo de *L. major* em *P. papatasi* foi posteriormente atribuído a interação entre os resíduos de galactose do LPG e um receptor expresso no epitélio intestinal do vetor denominado PpGalec (Kamhawi *et al.*, 2004). Ao final desta interação, as formas promastigotas procíclicas se diferenciam em formas metacíclicas infectantes, que podem ser inoculadas em um hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto do vetor.

No hospedeiro vertebrado, a primeira condição adversa enfrentada pelos parasitos é a atividade citolítica do sistema complemento. As modificações estruturais do LPG ocorridas durante a metaciclologênese de *L. major* (Sacks *et al.*, 1995), por exemplo, parecem exercer importante papel, pois estariam associadas à resistência ao complexo de ataque à membrana devido a uma barreira física constituída pela molécula de LPG, que se torna maior e mais espessa nas formas metacíclicas (Descoteaux, 1999). A subsequente internalização dos parasitos por macrófagos e/ou células dendríticas, etapa fundamental no estabelecimento da infecção, envolve diversas moléculas do hospedeiro como receptores do complemento e receptores manose-fucose, além das moléculas de superfície do parasito como LPG e GP63 (Bogdan, 1998).

Receptores do tipo Toll (TLR) são proteínas localizadas na membrana plasmática e em membranas internas de macrófagos, células dendríticas e células NK, além de estarem presentes na membrana de linfócitos T e B. Tais receptores conferem especificidade às células da imunidade inata por permitir o reconhecimento de categorias de moléculas associadas aos diferentes patógenos. Recentemente, foi demonstrado que os LPGs de diferentes espécies de *Leishmania* são capazes de ativar TLR2. A ativação deste receptor é dependente de uma proteína adaptadora denominada MyD88 e está associada a produção de citocinas pro-inflamatórias como IL-12 e TNF- α através da translocação de NF- κ B para o núcleo da célula (Becker *et al.*, 2003; De Veer *et. al*, 2003) (FIG 6). Vários estudos também demonstraram a participação de TLR4 e TLR9 na infecção por *Leishmania* (Tuon *et al.*, 2008).

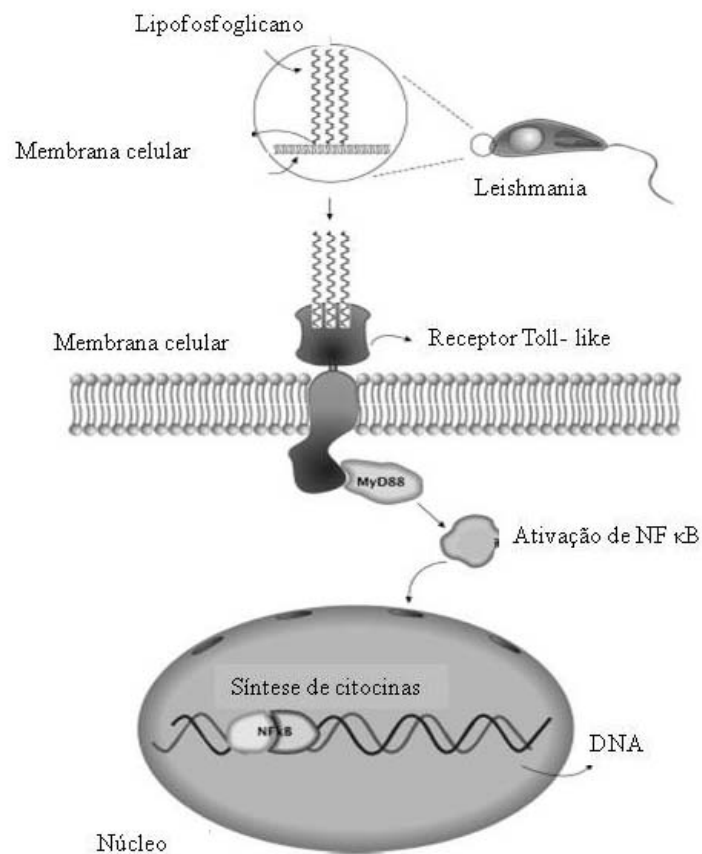


Figura 6: Via de sinalização Toll dependente da proteína adaptadora MyD88 durante a infecção por *Leishmania*. A ativação de receptores Toll like leva a produção de citocinas por meio da translocação nuclear de NF κ B. (Adaptado de Tuon *et al.*, 2008)

O LPG é capaz de interferir em vários processos, tanto na membrana como no citosol. A interação do parasito com sua célula hospedeira também pode ser mediada por receptores do complemento. Este tipo de reconhecimento deve favorecer a sobrevivência dos parasitos já que, neste caso, a fagocitose ocorre sem que haja explosão oxidativa. Além disto, a ligação desses receptores resulta na inibição da produção de IL-12, um mediador importante da imunidade celular (Sutterwala *et. al*, 1997). O LPG também é capaz de modular a maturação fagossomal, impedindo a fusão de lisossomos ao vacúolo parasitóforo. Esta modulação se dá através do acúmulo perifagossomal de filamentos de actina que dificultam a interação do fagossomo com os endossomos e lisossomos (Descoteaux, 1999; Cunningham, 2002; Lodge, 2005).

Outra estratégia utilizada por *Leishmania* para sobreviver dentro de sua célula hospedeira é a modulação da produção de moléculas efetoras. Entre elas, o óxido nítrico (NO) é importante no controle inicial da infecção devido a sua ação antimicrobiana (Proudfoot *et. al*, 1996). Já foi demonstrado que os parasitos e a porção glicana de seu LPG são capazes de modular a síntese de NO. Este processo parece estar associado à complexidade da porção glicana do LPG, conforme observado por Proudfoot e colaboradores (1996) a partir da utilização de fragmentos sintéticos de LPG.

Do que foi exposto é possível concluir que a molécula de LPG constitui um fator de virulência multifuncional tendo importância na interação dos parasitos com os hospedeiros vertebrado e invertebrado. Os polimorfismos nas unidades repetitivas do LPG e seu papel na interação parasito/vetor já foram amplamente estudados, sobretudo, para espécies do Velho Mundo. Entretanto, o polimorfismo intraespecífico e seu papel na interação parasito/ vetor e parasito/ hospedeiro vertebrado é pouco conhecido. Como parte de um projeto amplo envolvendo a glicobiologia de espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, este trabalho teve como objetivo a caracterização do LPG de outras cepas de *L. infantum*, dando continuidade ao trabalho iniciado com a cepa PP75 (Soares *et al.*, 2002) e a avaliação do papel de polimorfismos durante a interação do parasito com seus hospedeiros.

4 Metodologia

4.1 Cultivo Celular

As formas promastigotas das cepas de *L. infantum* (Tabela 1) e *L. donovani* (controle) foram cultivadas até a fase estacionária de crescimento ($> 1 \times 10^7$ células/mL). Os parasitos foram mantidos em estufa BOD a 25°C em meio definido 199 (Sigma®), acrescido de soro fetal bovino (10%), penicilina (100 U/ml), streptomomicina (50 µg/ml), glutamina (12,5mM), Hepes (40 mM), adenina (0,1 mM), 5-fluorocitosina (10 µg/mL), 6-biopterina (1 µg/mL) e hemina (0,0005%), pH 7,4 . (Soares *et al.*, 2002).

TABELA 1Cepas de *L. infantum* analisadas

Cepas de <i>L. infantum</i> ^a	Denominação usada no texto	Forma clínica ^c	Origem (cidade/Estado ^b /País)
MHOM/BR/74/PP75*	PP75	LV	Icatu/BA/Brazil
MHOM/BR/70/BH46	BH46	LV	Conselheiro Pena/MG/ Brasil
IIMCAN/BR/89/Ba-262	Ba262	LCan	Jacobina/BA/Brasil
MHOM/BR/2001/HP-EMO	EMO	LV	Pancas/ES/Brasil
MHOM/BR/1987/HCO-1	957	LV	ND/ES/Brasil
MCAN/BR/99/JP15	JP15	LCan	João Pessoa/PB/Brasil
MHOM/BR/1985/GS	640	LV	ND/BA/Brasil
MHOM/BR/2003/MMF	2566	LV	Cipolândia/MS/Brasil
240 (dog/BR/ND)	240	LCan	Belo Horizonte/MG/Brasil
291 (ND/BR/ND)	291	ND	Aracaju/SE/Brasil
MCAN/BR/2004/CUR268	268	LCan	Belo Horizonte/MG/Brasil
MCAN/BR/2004/CUR269	269	LCan	Belo Horizonte/MG/Brasil
MCAN/BR/2003/CUR211	211	LCan	Belo Horizonte/MG/Brasil
MCAN/FR/1982/PHAROAH	Pharoah	LCan	ND*/França
MHOM/TU/1980/IPT1	IPT1	LV	ND/Tunisia
MCAN/AL/1983/LIPA116	LIPA	LCan	ND/Algeria
<i>L. donovani</i> MHOM/SD/00/1S-2D*	1S-2D	LV	ND/Sudão

^a Códigos da Organização Mundial de Saúde : hospedeiro (MHOM, *Homo sapiens*; MCAN, *Canis familiaris*)/país/ano de isolamento / nome da cepa.

^b Estado brasileiros: MG, Minas Gerais; BA, Bahia; PB, Paraíba; MS, Mato Grosso do Sul; ES, Espírito Santo; SE, Sergipe.

^c LV, leishmaniose visceral, LCan, leishmaniose canina, ND, não determinado.

* Cepas de *L. infantum* (PP75) and *L. donovani* (1S-2D) usadas como controle.

4.2 Extração do LPG

Os parasitos foram lavados em PBS e centrifugados a temperatura ambiente por 7 minutos a 2100g. Para delipidação da amostra foram adicionados 2,5 mL da solução de clorofórmio/metanol (3:2) e 0,5 ml da solução de cloreto de magnésio a 4 mM. O material foi sonicado e centrifugado (7 minutos, 2100g) resultando em uma fase sólida intermediária com a qual o procedimento foi repetido.

À fase sólida foram adicionados 2,5 mL da solução de cloreto de magnésio a 4 mM. O material foi sonicado e centrifugado (7 min, 2100g) para a extração de proteínas. O sobrenadante foi desprezado e o procedimento repetido. Em seguida, foram adicionados 3,0 mL da solução de clorofórmio/metanol/água (10:10:3) e 0,5 mL da solução de clorofórmio/metanol (1:1) apenas na primeira etapa. O material foi submetido a três etapas de sonicação e centrifugação (7 minutos, 2100g) nas quais o sobrenadante contendo os GIPLs foi obtido.

Para extração do LPG foram adicionados 2,5 mL ESOAK (água/etanol/etil éter/piridina/NH₄OH; 15:15:5:1:0,017) ao sedimento resultante que foi sonicado e centrifugado (7 minutos, 2100g). O procedimento foi repetido três vezes e o sobrenadante contendo LPG foi obtido e, posteriormente evaporado utilizando-se nitrogênio em banho a 45°C (Orlandi, 1987).

4.3 Purificação do LPG

A amostra contendo LPG foi solubilizada em 1 mL da solução ácido acético 0,1 N/ cloreto de sódio 0,1 N, sonificada e submetida a uma cromatografia de interação hidrofóbica na qual a resina fenil-Sefarose foi utilizada. Aproximadamente 2mL de fenil-Sefarose foram aplicados em uma coluna Bio-Rad (#731-1550). A coluna foi lavada com 6 volumes de acético 0,1 N/ cloreto de sódio 0,1 N para empacotar a resina, de modo que o volume final após seu empacotamento estivesse entre 0,6-1,0 mL. Após o último mL de acético 0,1 N/ cloreto de sódio 0,1 N penetrar na coluna, a amostra contendo LPG foi adicionada. Em seguida, o material foi lavado de acordo com a seguinte seqüência: 1 mL de acético 0,1 N/ cloreto de sódio 0,1 N, 1 mL de ácido acético 0.1 N, 1 mL de dH₂O e 4 mL de ESOAK utilizado para eluir o LPG. A amostra foi novamente evaporada com nitrogênio em banho-maria a 45°C e, em seguida, solubilizada em 100 µL de água milli-Q e armazenada a 4° C (Soares *et al.*, 2002).

4.4 Dosagem do LPG

O LPG foi dosado pelo método fenol-ácido sulfúrico. Uma alíquota de 10 μ L de LPG purificado foi diluída em 190 μ L de água destilada. À amostra foram adicionados 200 μ L de fenol 5%. Em seguida, a amostra foi solubilizada com vórtex e 1mL de ácido sulfúrico foi gotejado sobre ela. Após um período de 30 minutos, a absorbância da amostra foi avaliada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 490nm. A curva padrão foi preparada com uma solução equimolar de galactose e manose (2mg/mL), de modo que os pontos correspondessem às seguintes concentrações: 50 μ g/mL, 100 μ g/mL e 150 μ g/mL (Dubois *et al.*, 1956).

4.5 Análise por Western blot

Para confirmar o sucesso da purificação, o LPG (\cong 5-10 μ g) foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (12 %) (Tabela 2).

TABELA 2

Soluções para o preparo dos géis de resolução e concentração (poliacrilamida 12%).

Gel de resolução	(mL)	Gel de concentração	(mL)
30% acrilamida /0,8% bisacrilamida	3,0	30% acrilamida /0,8% bisacrilamida	0,65
4x Tris HCl pH 8.8 (1,5M)	1,8	4x Tris HCl pH 6.8 (0,5M)	1,25
H ₂ O destilada e deionizada	2,6	H ₂ O destilada e deionizada	3,05
10% de persulfato de amônio (APS)	0,05	10% de persulfato de amônio (APS)	0,05
TEMED (N,N,N,N-Tetrametil-etilenodiamina)	0,005	TEMED (N,N,N,N-Tetrametil-etilenodiamina)	0,005

A amostra foi submetida à eletroforese com diferença de potencial constante de 100V. Em seguida, o material foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (45 μm) utilizando-se uma corrente de 42 mA por 1 hora. A membrana foi então bloqueada por 1 hora com a solução de caseína 5% e posteriormente incubada com o anticorpo primário CA7AE (1:1000) durante o mesmo intervalo de tempo. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-Tween (0,05%) com intervalos de 5 minutos entre cada lavagem e incubada por 1 hora com o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:10000). Após uma nova etapa de lavagem a membrana foi revelada com Luminol (Soares *et al.*, 2005).

4.6 Preparo das unidades repetitivas

4.6.1 Despolimerização do LPG

O LPG purificado foi despolimerizado após hidrólise ácida branda (HCl a 0,02N, 100°C, 5 min). Em seguida, a amostra foi submetida à partição butanol:água (1:2) e centrifugada por 6 minutos a 16000 g. A fase superior (butanólica) contendo a porção central e a âncora lipídica do LPG foi desprezada e o procedimento repetido. A fração aquosa contendo as unidades repetitivas e o cap foi evaporada em “speed-vac” (FIG.7).

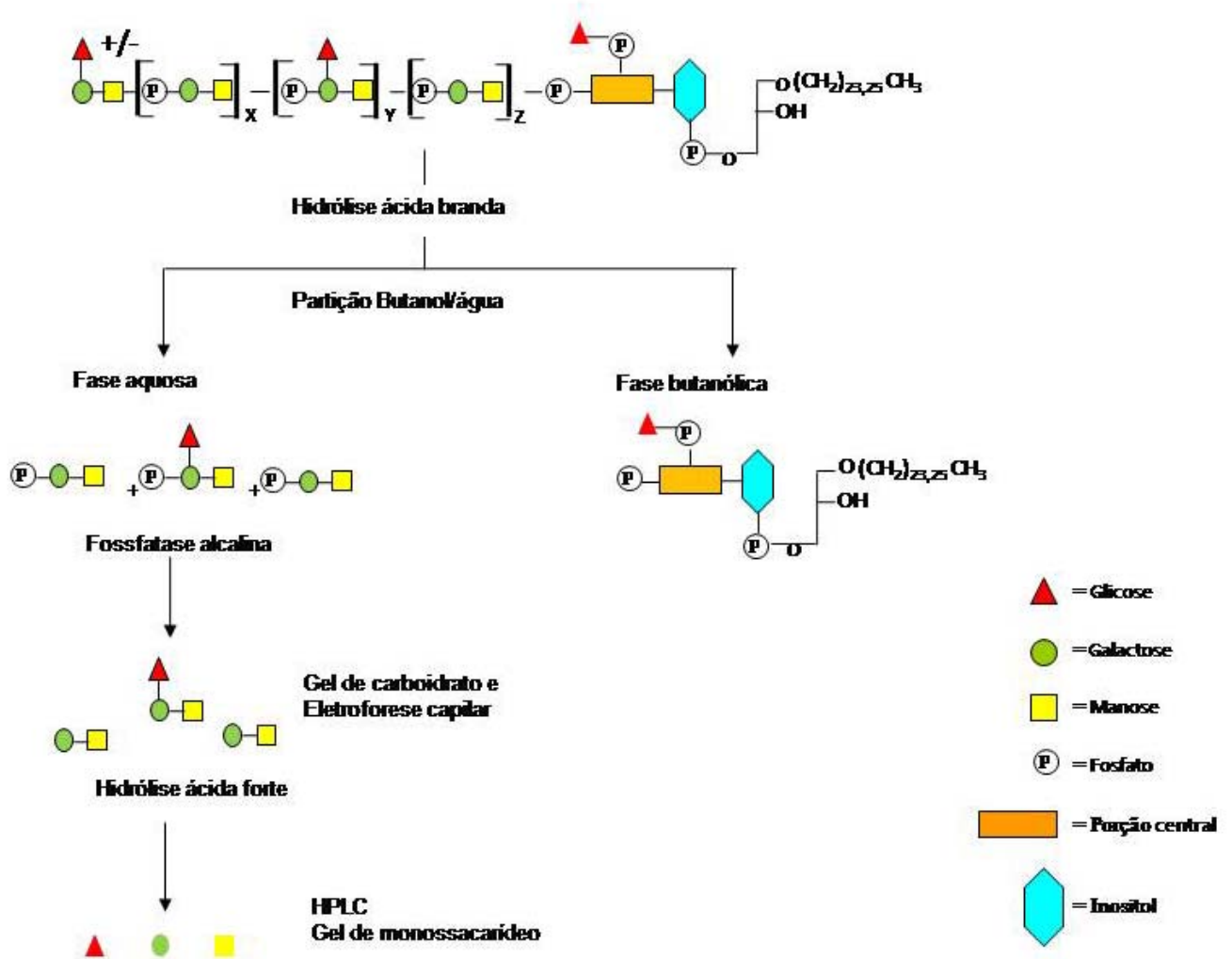


Figura 7: Esquema de fracionamento do LPG. A hidrólise ácida branda (HCl 0,02 N, 5 min, 100 °C) fragmenta o LPG e libera os glicanos neutros, fosforilados e a porção central-âncora lipídica. Estas últimas são separadas dos demais componentes após partição butanol:água (2:1). As unidades repetitivas fosforiladas foram tratadas com fosfatase alcalina. Os perfis foram posteriormente visualizados por meio de Eletroforese de carboidratos e Eletroforese Capilar. As unidades repetitivas foram submetidas à hidrólise ácida forte (ácido trifluoroacético 2N, 100 °C, 3 horas) para fragmentação em monossacarídeos. Esses foram analisados pela Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) e Eletroforese de monossacarídeo (adaptado de Mahoney *et al.*, 1999).

4.6.2 Tratamento enzimático

A amostra foi solubilizada em 150 μL de tampão 15 mM de Tris-HCl pH 9,0 ao qual foi adicionado 1 μL de fosfatase alcalina (2U). Em seguida, a amostra foi incubada a 37° C por 16 horas para clivagem dos grupos fosfato.

Em uma coluna Bio-Rad (#731-1550) foram adicionados 2mL da resina AG1-X8 de modo que o volume final após o empacotamento com metanol/água (1:1) fosse de 0,6 mL. Em seguida foram adicionados 2 mL da resina AG50W-X12 submetida ao mesmo procedimento. A amostra foi aplicada a essa coluna e o sal foi retido permitindo a eluição das unidades repetitivas neutras em 5 mL de água mili-Q. Uma alíquota desses oligossacarídeos foi tratada com β -galactosidase de *E. coli* (4U) em tampão fosfato de sódio (80mM, pH 7.3) e incubada a 37° C por 16 horas (Soares *et al.*, 2002).

O restante do material foi evaporado em “speed vac” e uma alíquota foi submetida à hidrólise ácida forte com ácido trifluoroacético (TFA 2N, 100°C, 3 h).

4.7 Eletroforese de carboidratos

Após a obtenção de unidades repetitivas neutras, fez-se necessário a derivatização destes carboidratos. Neste processo foi utilizado o 8-aminoftaleno-1,3,6-trissulfato (ANTS), um componente capaz de atribuir cargas negativas à amostra e absorver luz ultravioleta o que facilita, respectivamente, a separação eletroforética e a visualização da amostra. A marcação dos carboidratos com tal componente leva a formação de aminas cuja estabilidade depende da participação de agentes redutores como o cianoborohidreto.

Para tanto, as unidades repetitivas e o padrão de oligossacarídeos (G1-G7) foram marcados com 1 μL de solução de ANTS (0,05 M em 15% de ácido acético) e 1 μL de solução de cianoborohidreto de sódio (0,05 M). As amostras foram solubilizadas e incubadas por 16 horas a 37 °C.

Após a incubação, foram adicionados às amostras 2 μL de Tampão de amostra 2X (“thorin” a 0,01% em 20% de glicerol). O material foi então submetido à eletroforese de carboidratos (Tabela 3) em tampão 1X (glicina a 0,192 M; Tris-a 0,025 M, pH 8.3) sob corrente elétrica constante de 20 mA para cada gel no sistema por aproximadamente 50-60 minutos (4°C). O gel foi visualizado sob luz UV e fotografado (Soares *et al.*, 2004).

TABELA 3

Soluções para o preparo dos géis de resolução e concentração utilizados na eletroforese de carboidratos.

Gel de resolução	(mL)	Gel de concentração	(mL)
Solução de gel de resolução (38% acrilamida, 2% N,N'-metilenebisacrilamida)	6,0	Solução de gel de concentração (1,92M glicina, 0,25M Tris-base, pH 8,3)	2,0
Tampão de resolução 8x (1,5 M Tris-HCl, pH 8.9)	1,0	Tampão de concentração 8X (1M Tris-HCl, pH 6.8)	0,5
H ₂ O destilada	1,0	H ₂ O destilada	1,5
10% de persulfato de amônio (APS)	0,03	10% de persulfato de amônio (APS)	0,02
TEMED (N,N,N,N-Tetrametil-etilenodiamina)	0,01	TEMED (N,N,N,N-Tetrametil-etilenodiamina)	0,005

4.8 Eletroforese Capilar (CE)

Unidades repetitivas desfosforiladas foram novamente marcadas. Para eletroforese capilar, que é uma técnica mais sensível, o componente mais utilizado para marcação é o APTS (8 aminopireno-1,3,6- ácido trissulfônico). Para tanto, foi utilizado APTS a 0,02M em ácido acético (15%) e cianoborohidreto de sódio (1 M) em THF (tetraidrofurano). Após a incubação a 37 °C por 16 horas as amostras foram submetidas à eletroforese capilar com 25 kV por 20 minutos sob pressão de 5 psi. Unidades repetitivas de *L. donovani* (1S-2D) foram utilizadas como controle (Soares *et al.*, 2004).

4.9 Eletroforese de monossacarídeos

Aos monossacarídeos defosforilados, obtidos através de hidrólise ácida forte, foram adicionados 2µL de AMAC (solução de 2-aminoacridone a 0,1M em DMSO contendo ácido acético a 5%) e 2µL de cianoborohidreto de sódio (cianoborohidreto a 1 M em DMSO). Tais condições atribuem mudanças conformacionais e cargas parciais às amostras de modo que essas sejam mais facilmente separadas e visualizadas. As amostras foram incubadas por 18 horas a 37 °C ou 3 horas a 40 °C. Os géis de resolução e concentração foram feitos de acordo com a Tabela 4. O gel foi submetido à eletroforese em Tampão 1X (glicina a 0,1 M; Tris a 0,12 M, ácido bórico a 0,1 M, pH 8.3) sob corrente elétrica constante de 20 mA por

aproximadamente 1 hora. O gel foi visualizado sob luz UV e fotografado. Como padrão, foram utilizados os açúcares D-glicose, D-galactose e D-manose (100 µg/mL) (Sigma).

TABELA 4

Soluções para o preparo dos géis de resolução e concentração utilizados na eletroforese de monossacarídeos.

Gel de resolução	(mL)	Gel de concentração	(mL)
Solução de gel de resolução (10% acrilamida, 2% N,N' metilenebisacrilamida)	4,0	Solução de gel de concentração (10% acrilamida, 2,5% N,N' metilenebisacrilamida)	2,0
Tampão de resolução 4x (0,75 M Tris-HCl, 0,5 ácido bórico, pH 7.0)	2,0	Tampão de concentração 4x (0,5 M Tris-HCl, 0,5 ácido bórico, pH 6.8)	1,0
H ₂ O destilada	2,0	H ₂ O destilada	1,0
10% de persulfato de amônio (APS)	0,03	10% de persulfato de amônio (APS)	0,015
TEMED (N,N,N,N-Tetrametil-etilenodiamina)	0,01	TEMED (N,N,N,N-Tetrametil-etilenodiamina)	0,01

4.10 Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Os monossacarídeos gerados pela hidrólise das unidades repetitivas foram analisados por HPLC utilizando a coluna PA10 (4x250mm) com detector eletroquímico ED40 (DIONEX). A eluição dos carboidratos foi feita utilizando uma solução de NaOH (18 mM) (fluxo de 1mL/minuto, pressão de 2000 psi). Para a determinação dos picos, padrões (100µg/mL) de D-glicose, D- galactose, D- manose foram utilizados como controle.

O gel de monossacarídeos, a Eletroforese Capilar e o HPLC foram realizados no Laboratório de Glicobiologia de *Leishmania* da Universidade do Kentucky/USA em colaboração do Dr. Salvatore Joseph Turco.

4.11 Análise da produção de Óxido Nítrico (NO)

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram inoculados intraperitonealmente com 2ml de solução aquosa de tioglicolato 3%. Após 72 horas, macrófagos foram recuperados por lavagem da cavidade peritoneal utilizando meio RPMI gelado.

A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se azul de tripan. Em seguida, os macrófagos foram contados em câmara de Neubauer e suspensos em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Aliquotas de 200µL foram colocadas em uma placa de 96 poços de forma que a concentração final fosse de 5×10^5 células/poço. A placa foi incubada por 30 minutos à 37° C em 5% de CO₂ para adesão das células. Em seguida, o meio foi trocado por meio RPMI suplementado (10% SFB) acrescido de IFN-γ (20U/poço) e a placa foi novamente incubada à 37° C em 5% de CO₂ por um período de 24 horas.

Os parasitos utilizados no ensaio *in vitro* foram mantidos a 25°C em meio 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino até a fase estacionária de crescimento. Em seguida, eles foram contados em câmara de Neubauer e suspensos em meio RPMI suplementado (10% SFB) acrescido de polimixina B (50µg/mL).

A concentração foi ajustada para se obter uma relação de 10 parasitos para cada macrófago. Após o período de incubação de 24 horas, o meio foi retirado e alíquotas de 200µL do homogenado de parasitos foram colocados nos respectivos poços de forma que a concentração final por poço fosse de 5×10^6 parasitos. Cada amostra foi preparada em triplicata.

Nos poços destinados à interação com LPG, o meio foi substituído por meio RPMI suplementado (10% SFB) em presença de polimixina (50µg/mL). Em seguida, foram adicionados LPGs (0,5mM) das cepas estudadas e LPS (100 ng/mL) como controle positivo. Cada amostra foi preparada em triplicata. A placa foi incubada à 37° C em 5% de CO₂ por um período de 72h horas.

A quantificação de NO foi realizada de forma indireta pela dosagem de seu subproduto, nitrito, que é um composto mais estável presente no sobrenadante (Greiss Reagent System, 2009). Aliquotas de 50µL do sobrenadante dos macrófagos estimulados (com parasito ou LPG) foram transferidas para uma nova placa. Em seguida, foram adicionados 50µL da solução A (sufanilamida) e 50µL da solução B (cloridrato de *N*-(1-naftil) etilenodiamina ou NED).

Uma curva padrão foi preparada utilizando 100µL da solução de nitrito de sódio (0,2mM) no primeiro poço seguida pela diluição seriada (1:2) em meio RPMI. Em seguida, foram adicionados 50µL da solução A e 50µL da solução B.

As amostras e curva padrão foram preparadas em triplicata e a absorbância avaliada no comprimento de onda de 490nm.

4.12 Análise da densidade de parasitos de diferentes cepas de *L. infantum* no intestino de *L. longipalpis*

4.12.1 Captura e acondicionamento dos flebotomíneos

As populações de *L. longipalpis* foram coletadas na Gruta da Lapinha, situada na cidade de Lagoa Santa, no Estado de Minas Gerais. A coleta foi realizada com a utilização de armadilhas luminosas tipo CDC (Center for Disease Control light trap) (Sudia, 1962). Essas armadilhas foram colocadas em uma fenda da gruta onde é mantida uma ave que serve de atrativo para os flebotomíneos. Os insetos capturados foram mantidos no insetário do Laboratório de Entomologia Médica do CPqRR/FIOCRUZ.

4.13 Infecção experimental dos flebotomíneos por meio de alimentação artificial

4.13.1 Preparo do sangue com os parasitos

Camundongos foram anestesiados com Tiopental Sódico por via intramuscular. O sangue foi coletado no plexo venoso retro orbital com o auxílio de pipeta de Pasteur de ponta fina heparinizada. Em seguida, o sangue foi colocado em microtubos e centrifugado por 8 minutos a 1100g para separar o soro das hemácias.

O soro foi transferido para outro microtubo e incubado em banho-maria a 57 °C por 1 hora para inativação do sistema complemento. As hemáceas foram lavadas duas vezes em meio M199 sem soro, centrifugadas por 8 minutos a 1100g e mantidas no gelo.

Os parasitos foram contatos em câmara de Neubauer e adicionados à mistura de soro inativado e hemáceas em uma concentração final de 4×10^6 parasitos por mL de sangue.

4.13.2 Separação dos flebotomíneos

Potes plásticos foram utilizados para produção de potes de alimentação. O fundo desses potes foi substituído por gesso e a abertura superior revestida com filó contendo um pequeno orifício. Os insetos foram anestesiados em CO₂ e cerca de 90 fêmeas foram transferidas para os potes de alimentação.

4.13.3 Alimentação artificial

Pequenos recipientes de vidro transparente, com capacidade de 300-500 µl e semelhantes a funis invertidos, foram conectados através de finas mangueiras (tipo usadas em aquários) e utilizados como “aparelhos de alimentação artificial” (FIG. 8A).

A base inferior de cada recipiente de vidro foi revestida com pele fresca recém dissecada da parte ventral de frango jovem (*Gallus domesticus*). O sangue de camundongo contendo a concentração desejada de parasitos foi colocado na parte superior desse recipiente e o aparato, por sua vez, foi colocado sobre o orifício do filó, permitindo o acesso dos flebotomíneos.

Um sistema de “Banho-Maria” foi utilizado para manter a temperatura do sangue entre 38 e 40 °C através da circulação de água nas mangueiras que conectam os alimentadores. O tempo de repasto foi de 2-3 horas (FIG. 8B). Após esse período, as fêmeas alimentadas foram separadas e transferidas para novas gaiolas.

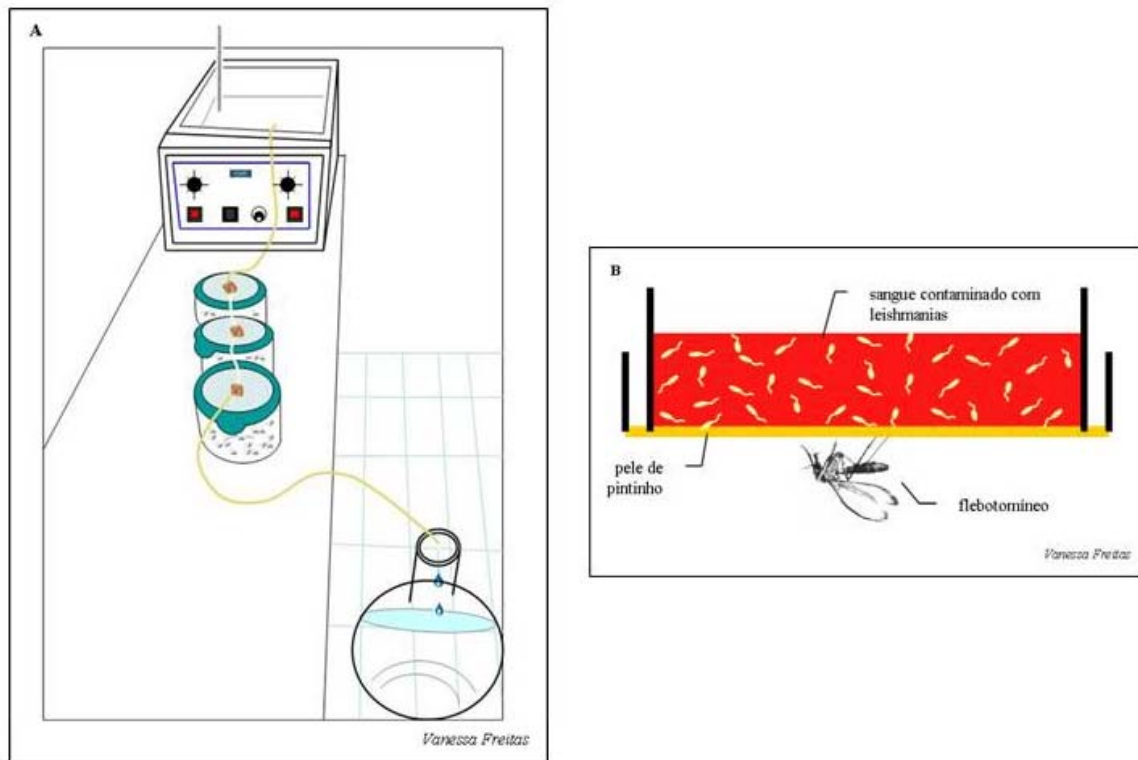


Figura 8: Esquema do processo de alimentação artificial. (A) Vista geral do processo de alimentação e dos potinhos contendo flebotomíneos. (B) Detalhe do alimentador artificial revestido por pele de pintinho (*G. domesticus*) contendo sangue mais promastigotas de *Leishmania*.

4.13.4 Manutenção dos flebotomíneos infectados

As fêmeas alimentadas com sangue foram mantidas com dieta de solução de sacarose 30% colocada em pequenos chumaços de algodão sobre a gaiola até o momento da dissecação. Foi realizada limpeza diária das gaiolas com retirada dos flebotomíneos mortos e aplicação, quando necessário, de solução de antibiótico gentamicina (250 µg/mL) no tecido das gaiolas para evitar contaminações secundárias.

4.14 Dissecação e análise do processo de infecção dos flebotomíneos

A densidade de parasitos foi avaliada no 2º e 6º dia após alimentação artificial. Estes pontos foram escolhidos para a análise por representar dois momentos importantes da dinâmica da digestão sanguínea e do desenvolvimento dos parasitos no trato intestinal de seu vetor. Em estudo detalhado do processo de infecção de *L. longipalpis* com *L. infantum* foi

demonstrado um declínio na densidade de parasitos entre o 2º e 3º dia de infecção devido à ação de enzimas digestivas e posterior recolonização do intestino com pico de densidade entre o 6º e 7º dia de infecção (Freitas *et al.* 2010, dados não publicados).

As fêmeas foram anestesiadas em baixa temperatura (-4 °C) por 5 minutos e transferidas para uma placa de Petri contendo PBS, pH 7.2, sobre gelo para imobilização dos insetos. Em seguida, elas foram colocadas em uma lâmina contendo uma gota de PBS e tiveram o intestino dissecado com a ajuda de estiletes e lupa.

Cada intestino foi colocado em um microtubo contendo 30 µL de PBS. O intestino foi macerado e 10µL do homogenado foi utilizado para contagem do número de promastigotas em câmara de Neubauer.

4.15 Análise Estatística

Os dados obtidos após a estimulação dos macrófagos com as diferentes cepas de *Leishmania* e seus respectivos LPGs foram representados através da média ± desvio-padrão. O teste Shapiro-Wilk foi realizado para avaliar a hipótese nula no caso dos dados possuírem uma distribuição Gaussiana (Shapiro, 1965). O valor P ($p > 0,05$) mostrou que os dados não apresentavam tal distribuição, por essa razão, o teste T student e o teste ANOVA foram realizados para avaliar a igualdade das médias entre os grupos e amostras independentes. Os dados foram analisados com a utilização do software GraphPad Prism 4.0 e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados referentes às densidades de parasitos no intestino do flebotomíneo foram avaliados com teste t. Os gráficos foram produzidos utilizando-se o programa GraphPad Prism 4.0.

5 Resultados

5.1 Purificação do LPG

Após a passagem em coluna de fenil-Sepharose e evaporação dos solventes orgânicos com nitrogênio, o LPG foi solubilizado em 100 μ L de água mili-Q. Uma alíquota do material foi aplicada em gel de poliacrilamida e posteriormente transferida para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com anticorpo CA7AE responsável pelo reconhecimento das unidades repetitivas Gal-Man-P comuns a todos LPGs de *Leishmania*. Os LPGs purificados de todas as cepas de *L. infantum* foram reconhecidos pelo anticorpo CA7AE (FIG. 9).

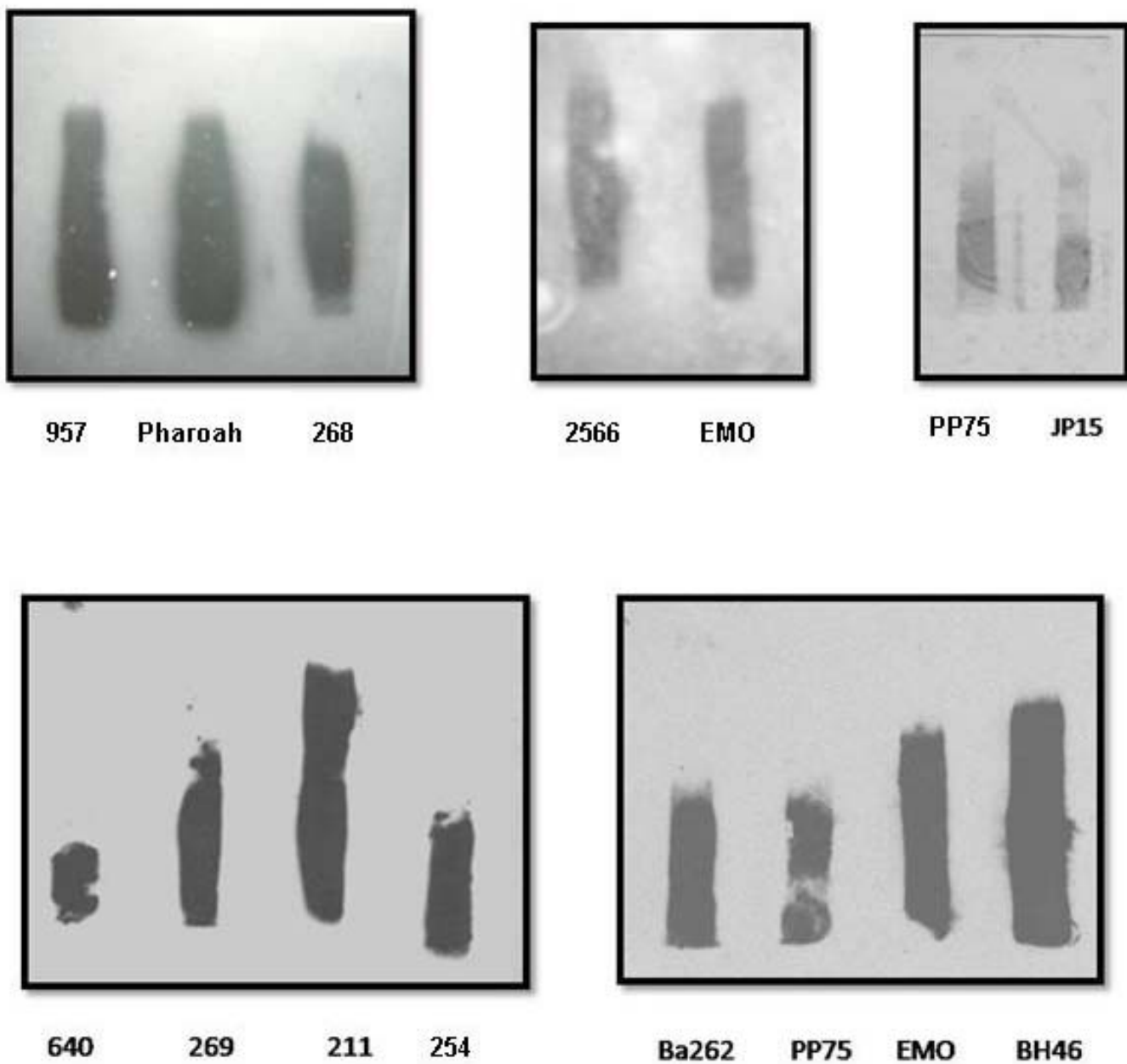


Figura 9: Western-blot de LPG purificado. Técnica realizada com o anticorpo CA7AE (1:1000) para detecção de Gal-Man-P presente em LPG de *Leishmania*. Foram utilizados 10 µg por canaleta do LPG de *L. infantum*. Os dados são representativos de 14 das 16 cepas analisadas.

5.2 Análise do perfil eletroforético das unidades repetitivas

Todos os LPGs foram hidrolisados para obtenção de suas unidades repetitivas. Essas unidades foram marcadas e submetidas à eletroforese para visualização dos perfis de carboidratos.

Para a identificação do número de açúcares foi utilizado um padrão de peso molecular de oligoglicoses (G1-G7) cujas bandas indicam o perfil de migração de mono a heptassacarídeo (FIG. 10A e B). Como controle, foram utilizadas unidades repetitivas do LPG de *L. donovani* (1S-2D). As unidades repetitivas desse LPG não possuem cadeias laterais e, por isto, migram na posição correspondente ao dissacarídeo Gal-Man (FIG. 10A).

Desta forma, foram identificados os seguintes perfis: **perfil I**- unidades repetitivas sem cadeias laterais que migraram na posição correspondente a um dissacarídeo (G2) junto com 1S-2D - cepas EMO, Ba262, (FIGS. 10B), **perfil II**- unidades repetitivas com cadeias laterais contendo um resíduo que migraram na posição correspondente a um trissacarídeo (G3) - cepa PP75 - (FIG. 10A) e **perfil III**- unidades repetitivas com cadeias laterais contendo mais que um resíduo -cepa BH46- (FIG. 10B). As demais cepas estudadas apresentaram o **perfil I** (dados não mostrados).

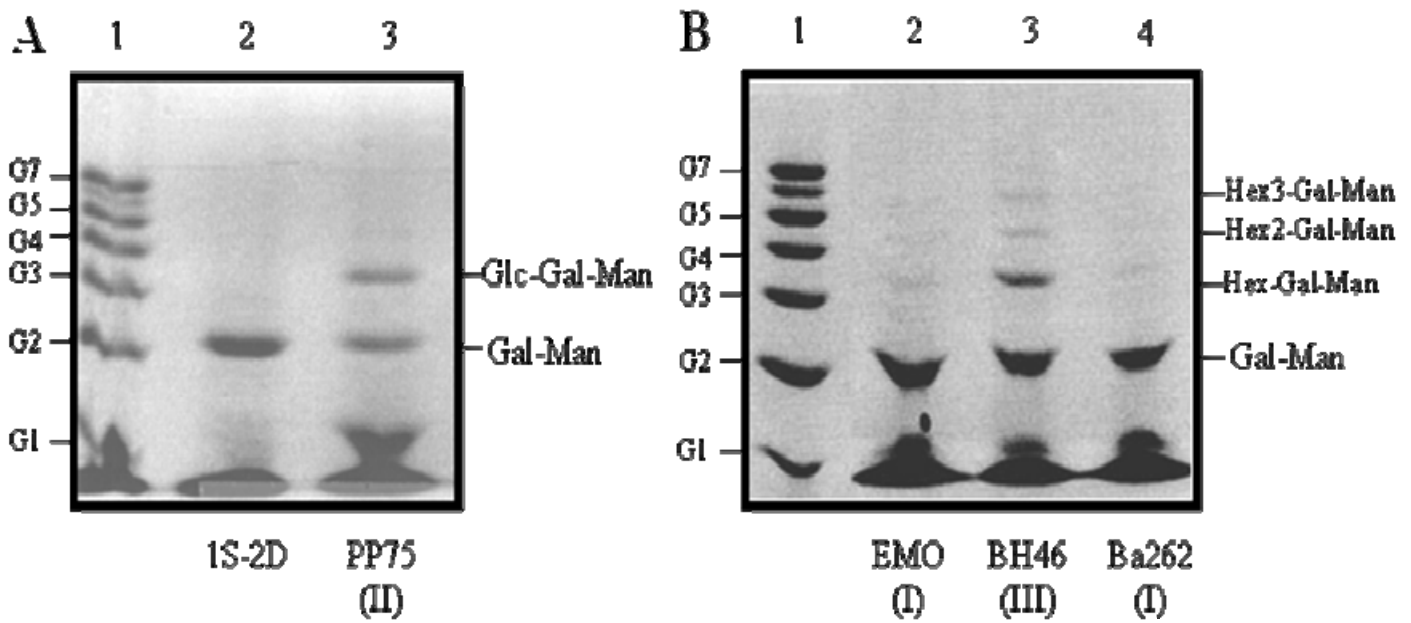


Figura 10: Perfis eletroforéticos das unidades repetitivas do LPG das diferentes cepas de *L. infantum*. (A) canaleta 1: padrão de oligoglicoses (G1-G7); canaleta 2: *L. donovani* (1S-2D); canaleta 3: *L. infantum* PP75. (B) canaleta 1: padrão de oligoglicoses (G1-G7), canaleta 2: *L. infantum* EMO, canaleta 3: *L. infantum* Bh46, canaleta 4: *L. infantum* Ba262. O número entre parêntese indica o tipo de unidade repetitiva: (I) Sem cadeia lateral, dissacarídeo; (II) cadeias laterais com um resíduo, trissacarídeo; (III) cadeias laterais com mais de um resíduo, tetra ou pentassacarídeo. Gal = galactose; Man = manose; Glc = glicose.

Para confirmar a presença de Gal (β 1,4)Man, estrutura comum às unidades repetitivas de todos os LPGs, os dissacarídeos da cepa 268, que apresentou perfil I, foram submetidos à digestão com β -galactosidase e mostraram-se susceptíveis como pode ser observado pela presença de uma banda correspondente a monossacarídeo (G1) (FIG. 11).

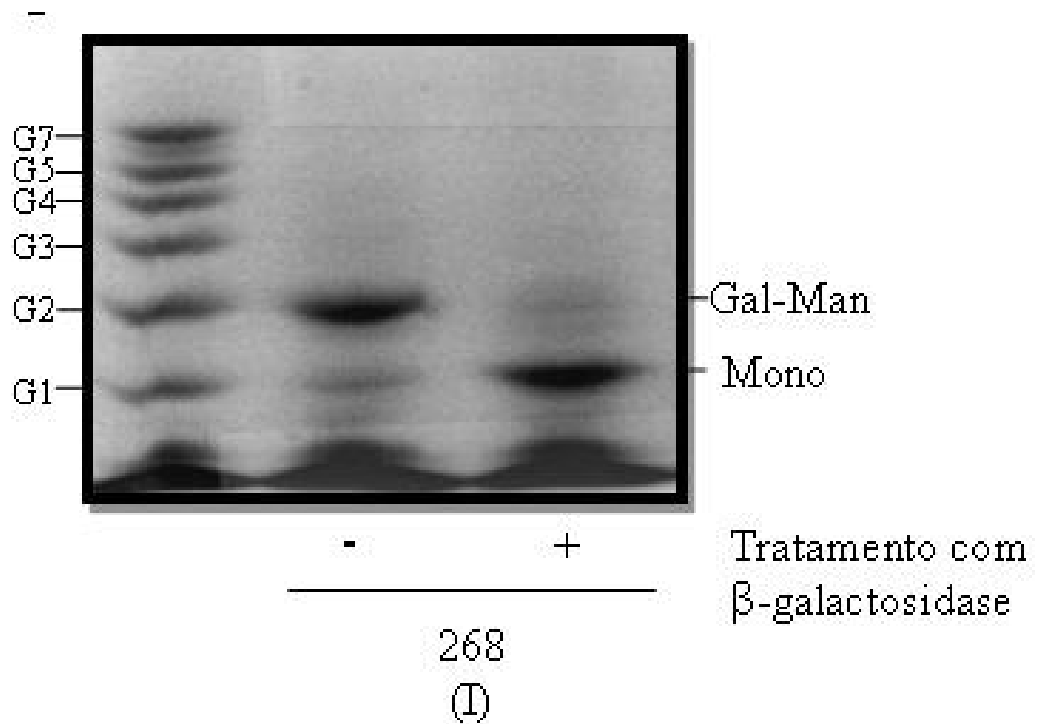
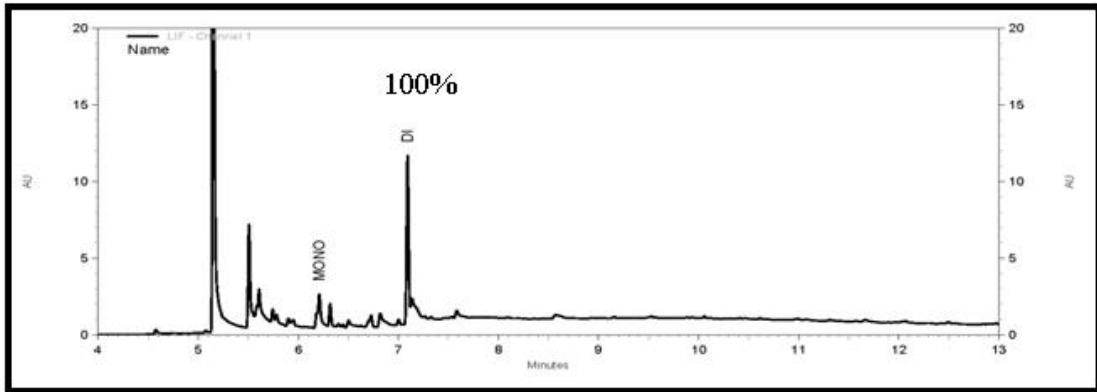


Figura 11: Perfil eletroforético das unidades repetitivas do LPG de *L. infantum* (cepa 268) antes e após o tratamento com β -galactosidase. Canaleta 1: padrão de oligoglicoses (G1-G7), canaleta 2: unidades repetitivas não tratadas com β -galactosidase, canaleta 3: unidades repetitivas tratadas com β -galactosidase.

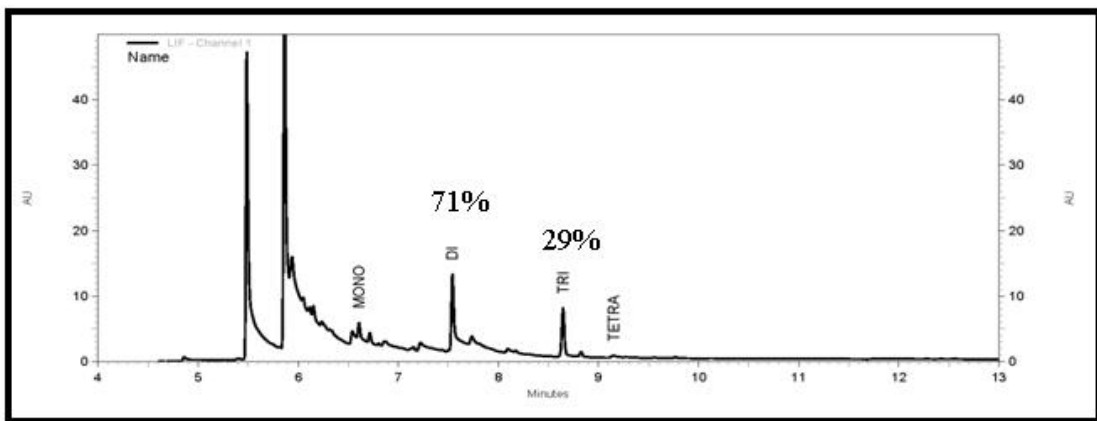
5.3 Eletroforese capilar das unidades repetitivas do LPG

Os perfis eletroforéticos observados no gel de carboidratos foram confirmados na eletroforese capilar que nos permitiu identificar além do pico de dissacarídeo Gal-Man comum a todos os LPGs, a proporção de cadeias laterais quando existentes. Confirmando os resultados obtidos na eletroforese de carboidratos, foi possível a identificação do perfil I - com cadeias laterais sem resíduo (FIG. 12A), perfil II - com cadeia laterais contendo um resíduo (Fig. 12B) e perfil III - com cadeias laterais contendo mais que um resíduo (FIG. 12C). No perfil II foi possível determinar que 29% das unidades repetitivas possuíam cadeias laterais. No perfil III as proporções de unidades repetitivas contendo di, tri, tetra e pentassacarídeos foram 23, 44, 17e 16%, respectivamente. Os três tipos de LPG identificados a partir da análise das diferentes cepas de *L. infantum* são apresentados na Tabela 5.

A) *L. infantum* (Ba262–tipo I)



B) *L. infantum* (PP75– tipo II)



C) *L. infantum* (BH46–tipo III)

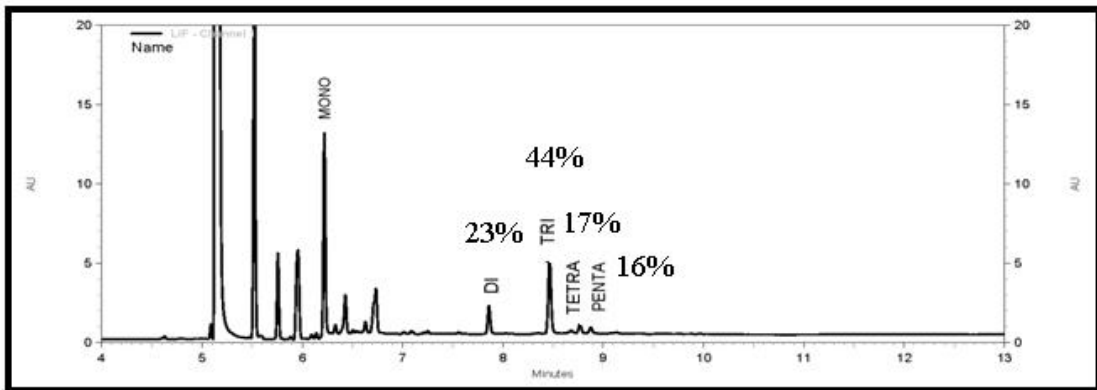


Figura 12: Perfis eletroforéticos das unidades repetitivas do LPG de *L. infantum* submetidas à eletroforese capilar. Perfil I - *L. infantum* Ba262 (Painel A), perfil II - *L. infantum* PP75 (Painel B) e perfil III - *L. infantum* BH46 (Painel C). Mono = monossacarídeos, Di = dissacarídeos, Tri = trissacarídeos, Tetra = tetrassacarídeos, Penta = pentassacarídeo.

Tabela 5Tipos de LPG observados nas cepas de *Leishmania infantum* analisadas.

Cepa(hospedeiro/país/ano/código)	Denominação usada no texto	Origem (cidade/estado)	Tipo de LPG
<i>L. infantum</i> (MHOM/BR/74/PP75)	PP75	Icatu/BA	II
<i>L. infantum</i> (MHOM/BR/70/BH46)	BH46	Conselheiro Pena/ MG	III
<i>L. infantum</i> (MCAN/BR/89/Ba-262)	Ba262	Jacobina/BA	I
<i>L. infantum</i> (MHOM/BR/2001/HP-EMO)	EMO	Pancas/ES	I
<i>L. infantum</i> (MHOM/BR/1987/HCO-1)	957	ND/ES	I
<i>L. infantum</i> (MCAN/BR/99/JP15)	JP15	João Pessoa/PB	I
<i>L. infantum</i> (MHOM/BR/1985/GS)	640	ND/BA	I
<i>L. infantum</i> (MHOM/BR/2003/MMF)	2566	Cipolândia/MS	I
<i>L. infantum</i> 240 (cão/BR/ND)	240	Belo Horizonte/MG	I
<i>L. infantum</i> 268 (cão/BR/ND)	268	Belo Horizonte/MG	I
<i>L. infantum</i> 269 (cão/BR/ND)	269	Belo Horizonte/MG	I
<i>L. infantum</i> 211 (cão/BR/ND)	211	Belo Horizonte/MG	I
<i>L. infantum</i> 291 (ND/BR/ND)	291	Aracaju/SE	I
<i>L. infantum</i> LTA110 (dog/BR/NA)	110	ND/MT	I
<i>L. infantum</i> (MCAN/FR/1982/PHAROAH)	Pharoah	ND	I
<i>L. infantum</i> (MCAN/PT/1998/IMT254)	IMT 254	ND	I
<i>L. infantum</i> (MHOM/TU/1980/IPT1)	IPT1	ND	I
<i>L. infantum</i> (MCAN/AL/1983/LIPA116)	LIPA	ND	I

Legenda: SD – Sudão; BR – Brasil; PT – Portugal; TU – Tunísia; AL – Argélia; FR – França; M – Mamalia; HOM – homem; CAN – cão, MG – Minas Gerais; BA – Bahia; PB – Paraíba; MT – Mato Grosso; MS – Mato Grosso do Sul; ES – Espírito Santo; SE – Sergipe. *ND – Não determinado. Tipos de LPG: I- com cadeias laterais sem resíduo; II- com cadeias laterais contendo um resíduo e III- com cadeias laterais contendo mais de um resíduo.

5.4 Análise do perfil eletroforético dos monossacarídeos

As análises anteriores não permitiram identificar qualitativamente os açúcares presentes nas cadeias laterais do LPG. Para isso foi necessário fragmentar as unidades repetitivas por meio de hidrólise ácida forte para obtenção de monossacarídeos. Os monossacarídeos gerados foram marcados com as soluções AMAC e cianoboroidreto, aplicados em gel de carboidrato e visualizados sob UV.

Para caracterização dos monossacarídeos foram utilizados 100µg/mL dos padrões D-glicose, D-galactose e D-manose (FIG. 13). Novamente, as unidades repetitivas do LPG de *L. donovani* (1S-2D) foram utilizadas como controle e, como esperado, apresentaram apenas as bandas correspondentes a galactose e manose já que não possui cadeias laterais.

No entanto, foi observada presença de níveis basais de glicose na cepa EMO, enquanto que a cepa BH46 apresentou uma banda mais proeminente de glicose indicando ser este o açúcar da cadeia lateral (FIG.13).

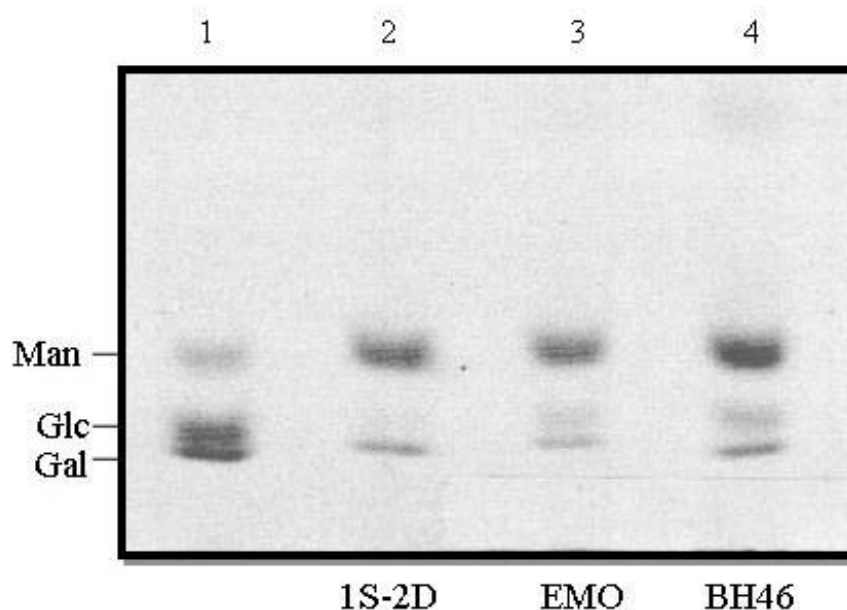
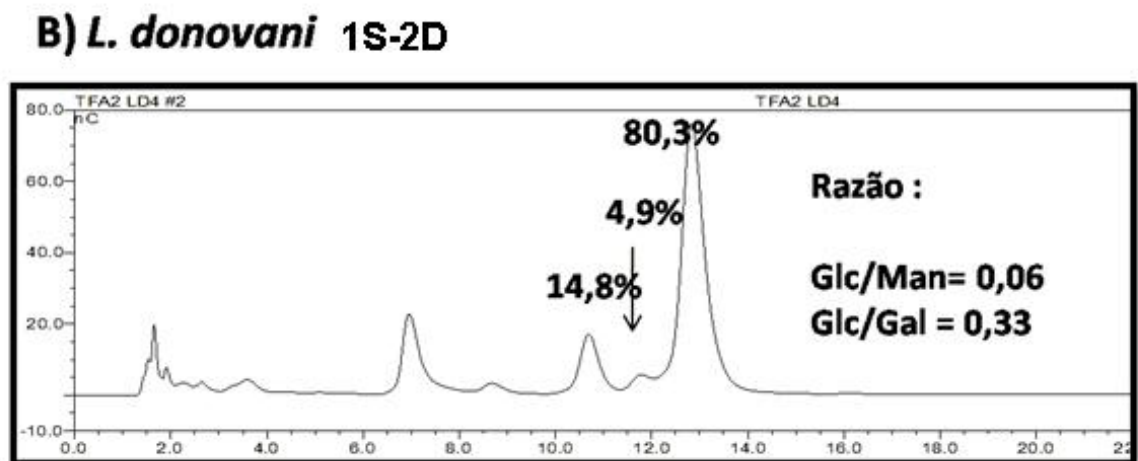
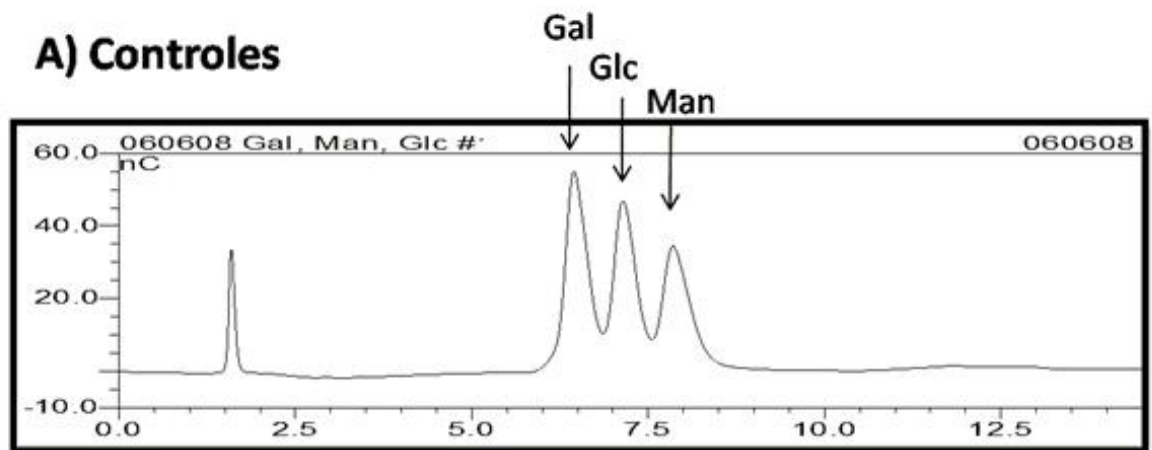


Figura 13: Perfis eletroforéticos dos monossacarídeos das unidades repetitivas do LPG de *L. donovani* 1S-2D (controle) e *L. infantum* (EMO e BH46). Man = manose; Glc = glicose; Gal = galactose.

5.5 Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Para se determinar com exatidão os níveis de glicosilação das unidades repetitivas do LPG das cepas EMO e BH46, a proporção entre os níveis de monossacarídeos foi avaliada utilizando HPLC (FIGS 14 e 15). Os padrões controles de D-Galactose, D-Glicose, D-Manose permitiram a completa separação dos picos (FIG. 14A). Por ser uma técnica mais sensível, no HPLC, os monossacarídeos resultantes da hidrólise das unidades repetitivas do LPG de *L. donovani* (1S-2D) (controle) apresentaram resíduos de glicose em proporções muito baixas sendo a razão Glc/Man considerada basal (0,06) (FIG. 14B). Este resultado confirma a inexistência de cadeias laterais na estrutura do LPG de *L. donovani* descrito anteriormente (SACKS, *et al.*, 1995) (FIG. 14C).



C) LPG da cepa de *L. donovani* (Sacks et al., 1995)

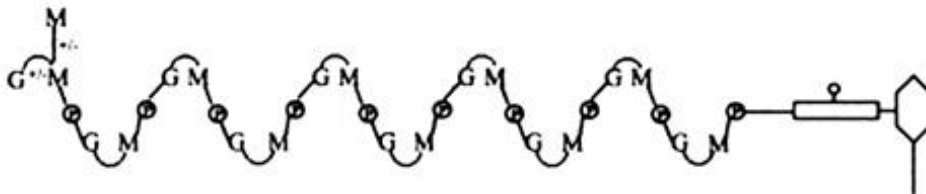


Figura 14: Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) de monossacarídeos do LPG de *L. donovani*. Paineis A, B, C, monossacarídeos das unidades repetitivas do LPG de *L. donovani* (1S2D); Paineis A, controles D-galactose, D-glicose e D-manose (100mg/mL); Paineis B, monossacarídeos das unidades repetitivas do LPG de *L. donovani* (1S2D); Paineis C, estrutura do LPG de *L. donovani*. Gal ou G = galactose; Man ou M = manose; Glc = glicose.

Os níveis de glicosilação observados no gel de monossacarídeo (FIG.13) para as cepas EMO e BH46 foram confirmados pela técnica de HPLC. A glicosilação para a cepa EMO foi baixa (razão Glc/Man = 0,13) (FIG.15B), enquanto que a da cepa BH46 foi cerca de quatro vezes maior do que a observada na cepa 1S2D (razão Glc/Man = 0,25) (FIG.15C). Este resultado confirma a baixa glicosilação na cepa EMO e a presença de glicoses no LPG da cepa BH46.

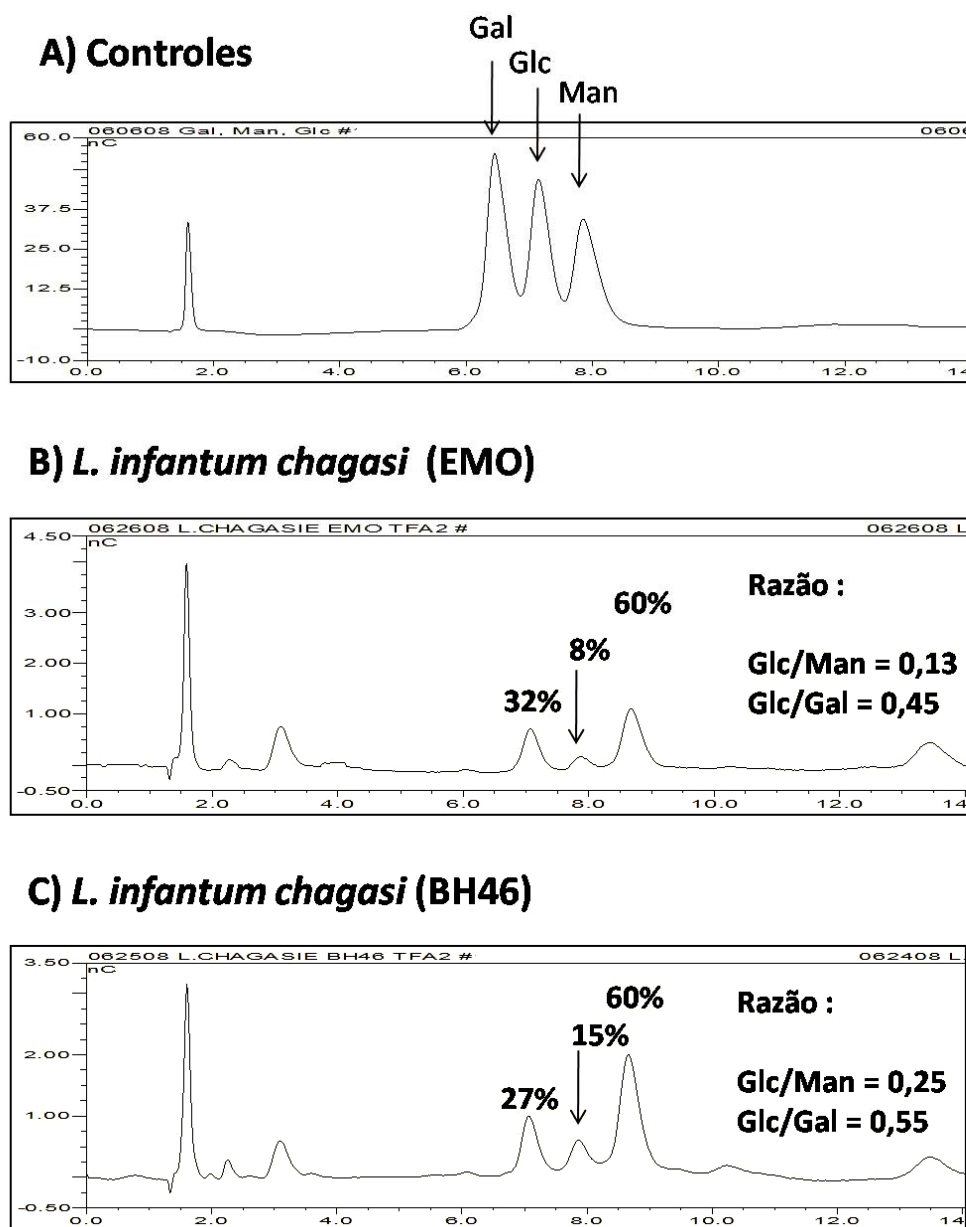


Figura 15: Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) de monossacarídeos do LPG de *L. infantum* (cepas EMO e BH46). Painel A, controles D- galactose, D- glicose e D- manose (100mg/mL); Painel B, monossacarídeos das unidades repetitivas do LPG de *L. infantum* (EMO); Painel C, monossacarídeos das unidades repetitivas do LPG de *L. infantum* (BH46). Gal ou G = galactose; Man ou M = manose; Glc = glicose.

5.6 Análise da produção de óxido nítrico (NO)

Entre as cepas de *Leishmania* estudadas, foram escolhidas as cepas Ba 262, EMO, IPT1, PP75 e BH46 como estímulo para avaliação da produção de NO por macrófagos murinos. As três primeiras cepas são representativas do LPG do tipo I, enquanto que as duas últimas são representativas dos LPGs do tipo II e III, respectivamente. A produção de NO por macrófagos murinos frente a esses diferentes estímulos é apresentada na figura 16.

A produção de NO por macrófagos estimulados por parasitos e seus respectivos LPGs bem como por LPS foi maior ($P < 0.0001$) quando comparado ao controle (IFN- γ) (FIG.16). Utilizando teste ANOVA, não foi observada diferença no estímulo da produção de NO entre os parasitos vivos ($p > 0,05$). No entanto, o mesmo teste revelou diferenças entre os LPGs testados de modo que parece haver uma tendência de LPGs glicosilados (tipos II e III) levarem a uma maior produção de NO quando comparados aos LPGs não glicosilados (tipo I) ($p < 0,0001$). Além disto, mesmo dentro do grupo de LPGs do tipo I houve diferença estatística, como pode ser observado pela menor produção de NO pelo LPG da cepa Ba262 comparado àqueles de EMO e IPT1 ($p < 0,001$). A produção de NO estimulada pelo LPG da cepa PP75 foi estatisticamente diferente de todas as outras cepas ($p < 0.0001$). Os níveis de NO produzido por macrófagos estimulados com LPG de PP75 foi tão alto quanto aqueles obtidos com LPS (controle) ($p > 0,05$).

Como esperado, a produção de NO induzida por LPS foi alta e inibida pela adição de polimixina B (dado não mostrado). Nenhum estímulo foi observado na ausência de INF- γ mesmo na presença de parasitos ou LPGs (dado não mostrado). Os resultados apresentados representam três experimentos consecutivos.

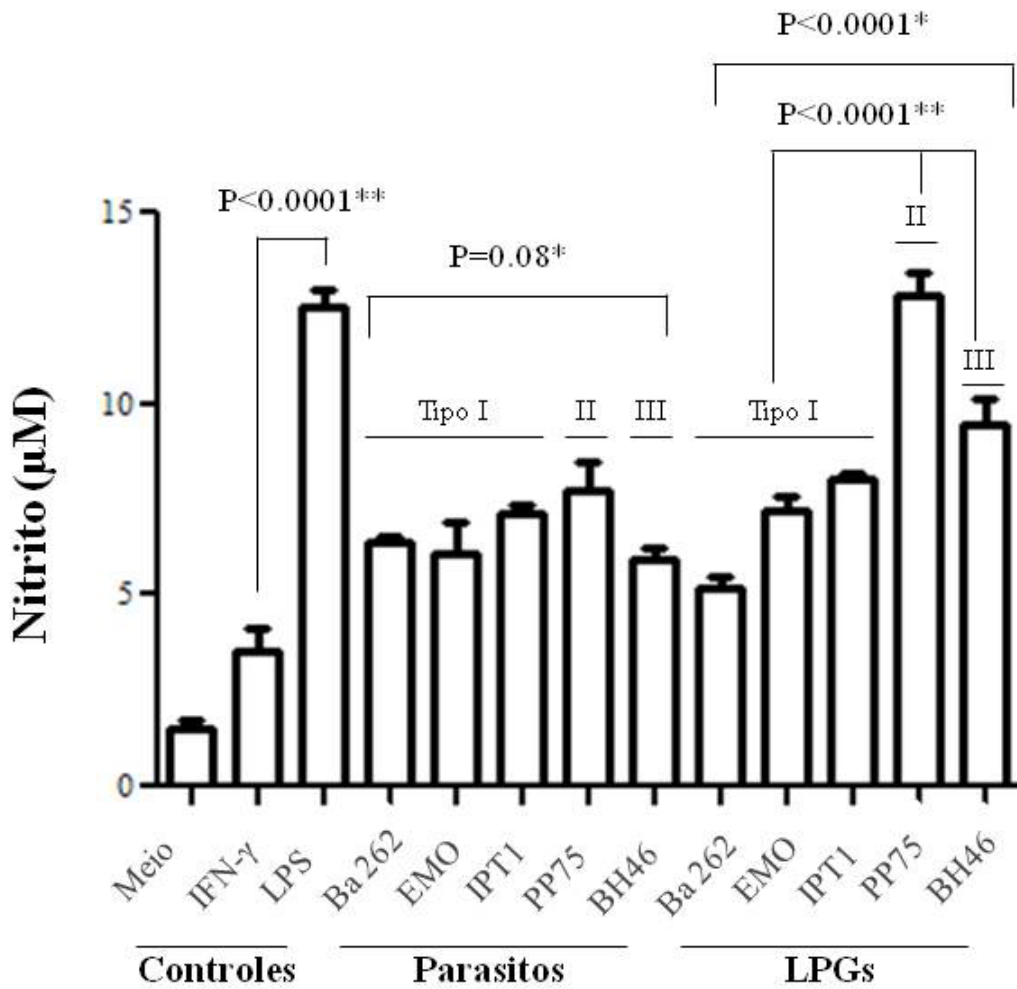


Figura 16: Produção de nitrito por macrófagos murinos estimulados por promastigotas de diferentes cepas de *L. infantum* e seus respectivos LPGs. Macrófagos murinos da linhagem(C57BL/6)foram primados com IFN- γ (100 IU/mL) e estimulados por parasitos vivos (10:1), LPGs (0,5mM) de *L. infantum* (cepas Ba262, EMO, IPT1, PP75, e BH46 que exibem diferentes tipos de LPGs- I, II e III) e lipopolissacarídeo (LPS). $p < 0,05$ é considerado significativo. * indica teste ANOVA, ** indica teste “t”. Os resultados são uma representação de três experimentos.

5.7 Análise da infecção de *Lutzomyia longipalpis*

Os parasitos das cepas representativas dos três tipos de LPG identificados (Ba262, EMO, IPT1, PP75, e BH46) foram contados em câmara de Neubauer e misturados ao sangue em uma concentração final de 4×10^6 parasitos por mL. O repasto sanguíneo durou 2-3 horas.

A densidade de parasitos foi avaliada no 2º e 6º dia após alimentação artificial por meio da dissecação dos intestinos e contagem de parasitos em câmara de Neubauer.

Independente do tipo de LPG (I, II ou III), os parasitos das diferentes cepas de *L. infantum* foram capazes de infectar *L. longipalpis* (FIG.17). Não houve diferença nas densidades de parasitos tanto no 2º quanto no 6º dia pós infecção ($P > 0,05$). Esses resultados representam dois experimentos.

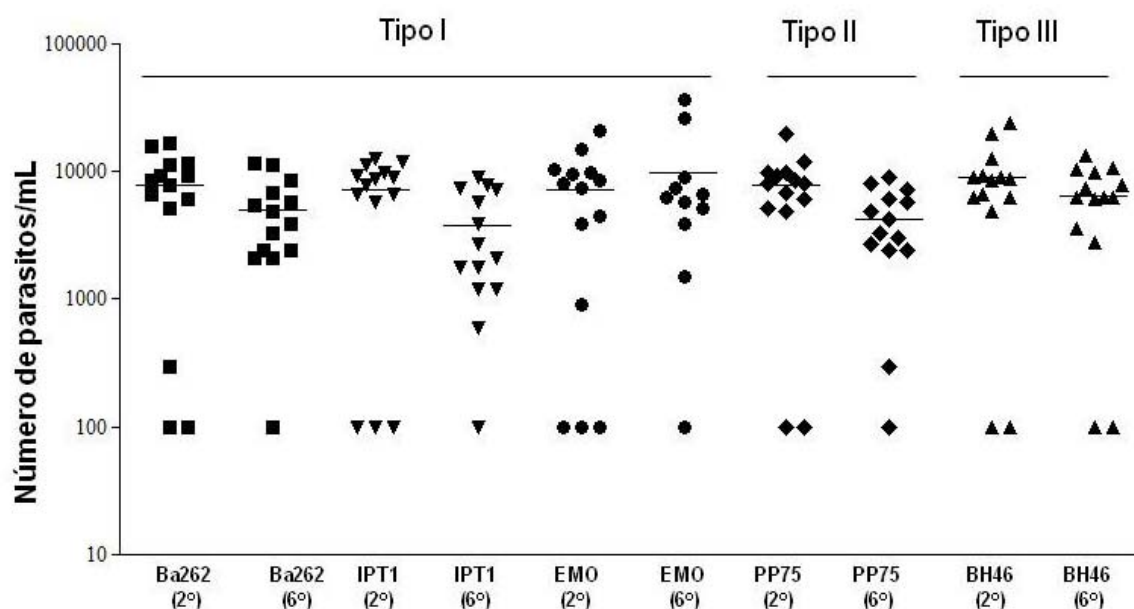


Figura 17: Densidade de parasitos no intestino médio de *L. longipalpis* artificialmente alimentado com *L. infantum* (cepas Ba262, EMO, IPT1, PP75 e BH46). As cepas utilizadas apresentam diferentes tipos de LPG (I, II e III). 2º=2 dias após a alimentação, 6º= 6 dias após a alimentação. Resultado representativo de dois experimentos.

6 Discussão

A LV causada por *L. infantum* é transmitida no Novo Mundo por *L. longipalpis* que possui uma ampla distribuição desde o México até a Argentina (Grimaldi, 1989). Na região Mediterrânea, Norte da África até o Iran, *L. infantum* é transmitida por *Phlebotomus ariasi* e *Phlebotomus perniciosus*, respectivamente (Ready, 2010). Na Ásia, a LV é causada por *L. donovani* e é transmitida por *Phlebotomus argentipes* (Mahoney *et al.*, 1999). A LV pode ser fatal se não tratada e constitui um problema de saúde pública emergente e re-emergente sendo atualmente considerada uma doença negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (Herwaldt, 1999; Ashford, 2000).

A diversidade genética em *L. infantum* tem sido explorada a partir de diversas abordagens moleculares como: (I) eletroforese de isoenzimas (MLEE) (Rioux *et al.*, 1990) (II) PCR seguida da análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RLFP) de genes codificadores de antígenos (gp63 e cpb) (Maurício *et al.*, 2001) e minicículos de kDNA (Morales *et al.*, 2001), (III) amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD) (Zemanová *et al.*, 2004) e tipagem por análise de microsátélites (MLMT) (Ochsenreither *et al.*, 2006).

Baseados nestes trabalhos, Lukes *et al.*, (2007) propuseram uma forte correlação entre a diversidade genética e a origem geográfica de espécies do complexo *L. donovani* de modo a sugerir uma nova taxonomia na qual apenas *L. infantum* e *L. donovani* fossem consideradas membros desse complexo. Além disto, foi demonstrado não existir diferenças moleculares marcantes entre *L. chagasi* e *L. infantum* (Ochsenreither *et al.*, 2006; Kuhls *et al.*, 2007; Maurício, 2000) o que permite supor que *L. infantum*, descrita por Nicolle em 1908 e *L. chagasi*, descrita por Cunha e Chagas em 1937, sejam a mesma espécie. Vale ressaltar, que a análise de microsátélites identificou baixo polimorfismo genético entre as espécies do zimodema MON-1 entre as quais estavam incluídas duas cepas utilizadas em nosso trabalho: PP75 e IPT1 (Ochsenreither *et al.*, 2006; Kuhls *et al.*, 2007).

Alguns autores têm se referido a *L. infantum* do Novo Mundo como *L. infantum chagasi* (Lainson, 2005). Esta terminologia foi contestada por Dantas-Torres (2006) uma vez que seria a primeira ocorrência de uma subespeciação no gênero *Leishmania*. Em nosso trabalho, utilizamos a nomenclatura *L. infantum* por considerarmos a mesma indistinguível de *L. chagasi*.

Esta é a primeira vez que uma abordagem bioquímica é utilizada para estudo comparativo de cepas de *L. infantum* do Velho e Novo Mundo. Este estudo foi baseado na caracterização das unidades repetitivas do lipofosfoglicano ou LPG.

O LPG está majoritariamente expresso na superfície de *Leishmania* e constitui-se como molécula fundamental para a sobrevivência do parasito já que participa de processos importantes como: a adesão ao epitélio intestinal do vetor, proteção contra a lise mediada pelo complemento e radicais gerados pela explosão oxidativa no hospedeiro vertebrado (Sacks, 2001).

O LPG é formado por quatro domínios: 1) âncora lipídica, 2) heptassacarídeo central, 3) unidades repetitivas e 4) cap (FIG. 2), dos quais os três primeiros são altamente conservados entre as diferentes espécies de *Leishmania*. Na maioria dos trabalhos o polimorfismo interespecífico do LPG tem sido avaliado. No entanto, o polimorfismo intraespecífico ainda é pouco estudado. Tal polimorfismo foi observado entre as cepas 1S-2D e MONGI de *L. donovani* do Sudão e Índia, respectivamente (Sacks *et al.* 1995; Mahoney *et al.*, 1999). A cepa 1S-2D possui cadeias laterais sem resíduos, enquanto que a cepa MONGI possui cadeias laterais com 1-2 resíduos de β -glicosés. Outra espécie em que o polimorfismo intraespecífico foi observado foi *L. tropica* (McConville *et al.*, 1995; Soares *et al.*, 2004). As cepas L810, L747 e L863 apresentaram níveis diferentes de galactosilação quando comparadas à cepa L75. As unidades repetitivas da cepa LRC-L456 de *L. major* não apresentam substituições ao contrário da cepa LRC-L580 que contém resíduos de galactose e arabinose (McConville *et al.*, 1995). Porém, todos estes trabalhos utilizaram um número limitado de cepas bem como procedências geográficas.

Neste trabalho, é a primeira vez que se avalia a estrutura das unidades repetitivas do LPG em um número considerável de cepas (16) e regiões geográficas (Brasil, França, Tunísia e Algéria). Os dados obtidos indicam que o polimorfismo no LPG de *L. infantum* é baixo, sendo que apenas as cepas PP75 e BH46 (11%) apresentaram um ou mais resíduos de glicose, respectivamente. A presença deste açúcar no LPG tem sido observada em cepas do Novo Mundo, tais como: *L. mexicana* (Ilg *et al.*, 1992); nas formas metacíclicas de *L. braziliensis* (Soares *et al.*, 2005) e *L. amazonensis* (Soares *et al.*, dados não publicados). A presença de glicosés também foi observada em *L. tropica* (McConville *et al.*, 1995) e *L. donovani* da Índia (Mahoney *et al.*, 1999). As outras cepas (89%) não apresentaram resíduos em suas cadeias laterais sendo seus LPGs similares à cepa de *L. donovani* do Sudão (Sacks *et al.*, 1995) e às formas procíclicas de *L. braziliensis* (Soares *et al.*, 2005). Estes dados indicam ser o fenômeno de glicosilação mais proeminente nas cepas do Novo Mundo. É interessante ressaltar que os três tipos de LPG foram encontrados no Brasil (FIG.18)



Figura 18: Distribuição geográfica das cepas de *L. infantum* utilizadas. Os pontos coloridos correspondem ao tipo de LPG apresentado por cada uma das cepas. Pontos vermelhos- LPG tipo I, ponto amarelo- LPG tipo II e ponto verde- LPG tipo III.

No entanto, um número limitado de cepas do Velho Mundo foi utilizado e, talvez, por esta razão não tenhamos observado polimorfismo nas mesmas. Como perspectivas iremos aumentar este painel de cepas, incluindo inclusive algumas de *L. infantum* que causam leishmaniose cutânea na região Mediterrânea e na América Central.

Os resultados obtidos permitiram a identificação de três tipos de LPG para as cepas de *L. infantum*. O LPG tipo para *L. infantum* será considerado aquele com ausência completa de cadeias laterais (tipo I), embora o primeiro LPG descrito (Soares *et al.*, 2002) possua cadeias laterais com um resíduo de glicose e seja aqui considerado como tipo II. É importante ressaltar o aparecimento pela primeira vez no Novo Mundo de um LPG oligo-glicosilado (cepa BH46) que foi caracterizado como tipo III. Na figura 19 estão representados os três tipos de LPG.

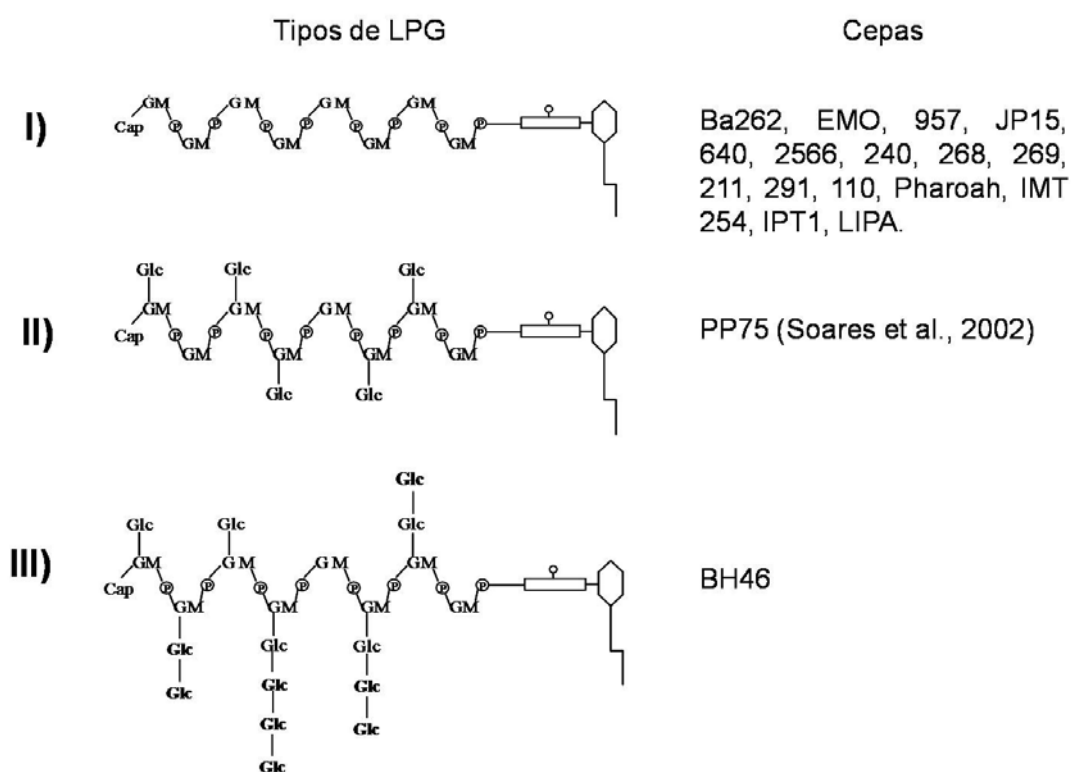


Figura 19: Diagrama esquemático dos três tipos de LPG observados entre as diferentes cepas de *L. infantum* analisadas.

O papel do polimorfismo intraespecífico do LPG de *L. infantum* foi avaliado durante a infecção experimental de *L. longipalpis* com as cepas Ba262, EMO, IPT1, PP75 e BH46, que são representativas dos três tipos de LPG. Para todas as cepas analisadas, a densidade de parasitos encontrados no intestino se manteve alta no 6º dia após a infecção. Este é o primeiro estudo que infectou com sucesso *L. longipalpis* com diferentes cepas de *L. infantum*. Estes resultados podem estar relacionados à alta permissividade de *L. longipalpis* a diferentes cepas

e espécies. Este vetor já foi infectado com uma gama de patógenos desde vírus até helmintos (revisado por Soares, 2003). No entanto, ao contrário do que ocorre em *P. papatasi* e *P. sergenti* em que o polimorfismo dos LPGs parece controlar a competência vetorial (Pimenta *et al.*, 1992; Kamhawi *et al.*, 2000) não foi observada em nosso trabalho qualquer relação entre os diferentes LPGs e o desenvolvimento do parasitos no vetor.

A participação do LPG na ligação de promastigotas ao epitélio intestinal dos insetos vetores foi anteriormente sugerida (Sacks *et al.*, 1995). Além disso, tal participação parece ainda mais evidente quando se considera ensaios *in vitro* em que foram observadas a ligação de LPGs purificados ao intestino e a inibição da ligação de promastigotas ao intestino por essas moléculas (Pimenta *et al.*, 1992; 1994; Sacks *et al.*, 1995; Soares *et al.*, 2002; 2010). Porém, foi durante o experimento com mutantes incapazes de produzir LPG (Butcher *et al.*, 1996) que esta estrutura foi considerada crucial para a manutenção da infecção *in vivo* com *L. major*. Entretanto, outros autores conseguiram infectar *L. longipalpis* (Jacobina) com *L. major* mutante para LPG (Myskova *et al.*, 2007), embora não tenha sido utilizado uma combinação natural.

Estudos utilizando mutantes da cepa BH46 de *L. infantum* em nosso laboratório não conseguiram infectar *L. longipalpis* sendo que os parasitos morrem pela ação das enzimas digestivas, muito antes da adesão ao epitélio (Freitas *et al.*, dados não publicados). Estes dados demonstram que o LPG é crucial para a interação com vetor no modelo *L. infantum-L. longipalpis* e seu baixo polimorfismo poderia justificar o sucesso do estabelecimento desta espécie tanto nos vetores do Velho como Novo Mundo. Finalmente, embora o uso de cepas mutantes tenha confirmado a participação do LPG na interação parasito-vetor, outros glicoconjugados como sAP, PPGs e PGs parecem exercer papel fundamental na sobrevivência dos parasitos no estágio inicial da infecção (Sacks *et al.*, 2000; Secundino *et al.*, 2010).

O LPG é um importante agonista dos receptores do tipo toll 2 (TLR2) (Tuon *et al.*, 2008). A ativação desse receptor depende da integridade da âncora lipídica do LPG. Como essa porção é conservada entre os LPGs das diferentes espécies de *Leishmania*, a porção glicana do LPG também deve desempenhar importante papel na ativação de TLR2. Esta hipótese foi confirmada recentemente pela observação de que variações nas cadeias laterais em LPGs de diferentes espécies de *Leishmania* desencadearam produção diferencial de citocinas tais como: INF- γ , TNF- α e IL-12 (Feng *et al.*, 1999; De Veer *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2003).

O papel do polimorfismo intraespecífico do LPG de *L. infantum* também foi avaliado por meio da análise da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos estimulados

com as mesmas cepas utilizadas na infecção experimental de *L. longipalpis*. Além dos parasitos, os macrófagos foram estimulados com os respectivos LPGs.

Embora os parasitos tenham dirigido a produção de NO, não foram observadas diferenças entre as cepas utilizadas. De forma semelhante, Gantt *et al.* (2001) demonstraram o papel de O₂⁻ e NO na morte de patógenos intracelulares em macrófagos humanos e murinos infectados com *L. infantum*. Quanto aos LPGs parece existir uma relação entre a estrutura da molécula e a produção de NO, já que foram observadas diferenças entre todos LPGs testados e mesmo dentro do grupo de cepas que apresentam LPG do tipo I. Além disso, a produção de NO por LPG glicosilado (tipo II) foi maior quando comparada as demais cepas.

Utilizando LPG de *L. major* e fragmentos sintéticos de PG, Proudfoot *et al.* (1996) também mostraram que esses glicoconjugados foram capazes de estimular a produção de NO quando co-estimulados com IFN- γ e que este efeito regulatório era dependente da porção glicana do LPG. Da mesma forma, nossos dados utilizando macrófagos murinos estimulados com IFN- γ mostraram uma relação entre a porção glicana do LPG e a produção de NO, de modo que parece existir uma tendência de LPGs glicosilados (tipo II) e talvez (tipo III) levar a uma maior produção de NO. Estes dados corroboram aqueles encontrados por Proudfoot *et al.* (1996) em que PGs com estruturas mais complexas estavam associados à maior produção de NO em *L. major*.

Embora estes dados indiquem uma tendência de LPGs glicosilados estimularem maior produção de NO, uma correlação entre a estrutura do LPG e a virulência ainda não pode ser determinada e é, provavelmente, cepa-específica. No entanto, durante a infecção in vivo é possível especular que outras moléculas poderiam estar modulando a produção de NO juntamente com LPG.

Juntos, os resultados obtidos neste trabalho indicam que o polimorfismo intraespecífico do LPG de *L. infantum* não tem efeito sobre a interação do parasito com seu vetor, mas exerce papel regulatório sobre a produção de uma importante molécula efetora do sistema imune inato do hospedeiro vertebrado. Além disso, a caracterização de todos estes LPGs confirma os dados de estudos moleculares anteriores e nos permitem considerar que *L. chagasi* e *L. infantum* são a mesma espécie.

7 Conclusões

- 1) Foram observados três tipos de variações na molécula de LPG: tipo I, unidades repetitivas sem cadeias laterais; tipo II, unidades repetitivas com cadeias laterais contendo um resíduo de β -glicose e, tipo III, unidades repetitivas com cadeias laterais contendo até três resíduos de glicose;
- 2) Não foram observadas diferenças na densidade de parasitos no intestino do vetor infectado com as cepas de *Leishmania* que exibem um dos três tipos de LPG;
- 3) Foi observada uma tendência à maior produção de Óxido Nítrico por macrófagos murinos estimulados por LPGs glicosilados do tipo II;
- 4) A caracterização bioquímica destes LPGs confirma os dados de recentes estudos moleculares e permite concluir que *L. chagasi* e *L. infantum* constituem uma única espécie.

8 Anexo

8.1 Artigo final: Coelho-Finamore JM, Freitas VC, Assis RR, Melo MN, Novozhilova N, Secundino NF, *et al.* *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. Int J Parasitol 2011; 41(3-4):333-42.

Leishmania infantum: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts

J. M. Coelho-Finamore^a, V. C. Freitas^a, R. R. Assis^a, M. N. Melo^b, N. Novozhilova^c,
N. F. Secundino^a, P. F. Pimenta^a, S. J. Turco^c, R. P. Soares^{a,*}

^a *Laboratory of Medical Entomology, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brazil*

^b *Department of Parasitology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

^c *Department of Biochemistry, University of Kentucky Medical Center, Lexington, KY, USA*

* Corresponding author. Address: Laboratory of Medical Entomology, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Av. Augusto de Lima, 1715, 30190-002, Belo Horizonte, MG, Brazil. Tel.: +55 31 3349 7797; fax: +55 31 3295 3115.

E-mail address: rsoares@cpqrr.fiocruz.br (R. P. Soares).

Abstract

Intraspecies variations in the lipophosphoglycan (LPG) have been the focus of intense study over the years due its role in the specificity during sand fly-*Leishmania* interaction. This cell surface glycoconjugate is highly polymorphic among species with variations in sugars that branch off the conserved Gal(β 1,4)Man(α 1)-PO₄ backbone of repeat units. However, the degree of intraspecies polymorphism in the LPG of *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) is not known. In this study, the intraspecific variation in the repeat units of LPG was evaluated in 16 strains of *L. infantum* from Brazil, France, Algeria and Tunisia. The structural polymorphism in the *L. infantum* LPG repeat units was relatively slight and consisted of three types: Type I, which does not have side chains; type II, having one β -glucose residues that branch off the disaccharide-phosphate repeat units and, type III, having up to three glucose residues (oligo-glycosylated). The significance of these modifications was investigated during in vivo interaction of *L. infantum* with *Lutzomyia longipalpis* and, in vitro interaction of the parasites and respective LPGs with murine macrophages. There were no consequential differences in the parasite densities in the sand fly midgut infected with *Leishmania* strains exhibiting type I, II and III LPGs. However, a higher nitric oxide (NO) production was observed in macrophages exposed to glycosylated type II LPG.

Keywords: *Leishmania infantum*; lipophosphoglycan; *Lutzomyia longipalpis*; intraspecific variation; interaction.

1. Introduction

Visceral Leishmaniasis (VL) is caused by *Leishmania (Leishmania) infantum* (syn. *Leishmania (L.) chagasi*) and *Leishmania (L.) donovani*. This disease has a broad range of manifestations from asymptomatic or subclinical infection to acute, subacute, or chronic course (Herwaldt, 1999). *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) is the main vector of VL in Latin America (Grimaldi, 1989). In the Mediterranean Western Basin, VL is mainly transmitted by *Phlebotomus perniciosus* (Ready, 2010). In the spite of being a rural disease, VL is urbanizing as a result of environmental changes and vector adaptation to the human habitats and domestic reservoirs (Ashford, 2000).

The dominant cell surface glycoconjugate of *Leishmania* is the lipophosphoglycan (LPG), which has been implicated in a wide range of functions both in the vertebrate and invertebrate hosts. In the vertebrate host, this virulence factor's main functions include: attachment and entry into macrophages, modulation of nitric oxide (NO) production (Brittingham and Mosser, 1986), inhibition of protein kinase C (Giorgione et al. 1996) and induction of neutrophil extracellular traps (NETs) (Guimarães-Costa et al., 2009). In the invertebrate host, variations in the LPG have been implicated in the specificity of different sand fly species to *Leishmania* (Pimenta et al., 1992; 1994), where attachment of the parasite to a microvilli receptor is a crucial event during the interaction parasite-vector (Kamhawi et al., 2004).

LPG structures have already been described for several dermatropic and viscerotropic *Leishmania* species (Mahoney et al., 1999; McConville et al., 1992; 1995; Sacks et al., 1995; Soares et al., 2002, 2004, 2005). However, there is no available information on the degree of variability in the LPG structure from Old and New World strains of *L. infantum*. Basically, the LPGs have a conserved glycan core region of Gal(α 1,6)Gal(α 1,3)Gal(β 1,3)[Glc(α 1)-PO₄]Man(α 1,3)Man(α 1,4)-GlcN(α 1) linked to a 1-*O*-alkyl-2-*lyso*-phosphatidylinositol anchor. The salient feature of LPG is another conserved domain consisting of the

Gal(β 1,4)Man(α 1)-PO₄ backbone of repeat units (n~15-30). The distinguishing feature of LPGs responsible for the polymorphisms among *Leishmania* species is in the variability of sugar composition and sequence of branching sugars attached to the repeat units and cap structure (Turco and Descoteaux, 1992). For example, *L. infantum* (strain PP75) LPG contains β -glucoses attached to the C3 hydroxyl of the repeat unit galactose (Soares et al., 2002).

Intracellular parasitism by *Leishmania* and the involvement of LPG has been the subject of investigation previously (Alexander, 1999; Descoteaux, 2002). As an example, LPGs of *Leishmania* were identified as potent agonists of TLR2 in human NK cells and murine macrophages, triggering the production of TNF- α and IFN- γ via a functional MyD88 adaptor protein. Importantly, the integrity of the lipid anchor is necessary for activity (Becker *et al.*, 2003; de Veer *et al.*, 2003). Early studies by Proudfoot *et al.* (1996) showed that *L. major* LPG synergized with IFN- γ for the induction of iNOS expression in murine macrophages *in vitro*. Also, this regulatory activity of LPG was contained within the PG moiety. Since the lipid moiety is conserved, it is still unknown if intraspecific variations in the PG carbohydrate portion will trigger different responses in the New World species *L. infantum*.

Intraspecific variation in the LPG is poorly understood. In *L. donovani* (Sudan) the LPG is devoid of side-chains (Sacks *et al.*, 1995) whereas the Indian strain possesses 1-2 β -glucose residues in the repeat units (Mahoney *et al.*, 1999). In *Leishmania major*, the LV39 strain has longer poly-galactosylated side-chains, whereas Friedlin (FV1) strain has shorter galactosylated side-chains often capped with α -arabinose residues (McConville *et al.*, 1992; Dobson *et al.*, 2003). In *L. tropica*, intraspecific LPG variability was assessed in the Israeli strains L810/L863 and L747, where the presence of β -galactose residues was determinant in preventing their development in *Phlebotomus sergenti* (Kamhawi *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2004). In this study, we report for the first time the intraspecific LPG variability of *L.*

infantum (Brazil, Europe and Africa). Those polymorphisms were evaluated during the interaction with *L. longipalpis* and murine macrophages.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Materials were obtained as follows: Medium 199 from Gibco Life Technologies; foetal calf serum (FCS) from Atlanta Biologicals; AG50W-X12 cation-exchange resin, AG1-X8 anion-exchange resin from Bio-Rad (Hercules, CA); phenyl-sepharose CL-4B, alkaline phosphatase (*Escherichia coli*) from Sigma.

2.2. Parasites

Leishmania strains are listed in Table I. Starter cultures of promastigotes were grown in Medium 199 supplemented with 10% heat-inactivated FCS, penicillin (100 units/ml), streptomycin (50 µg/ml), 12.5 mM glutamine, 0.1 M adenine, 0.0005% hemin, and 40 mM HEPES, pH 7.4 at 25 °C (Soares et al., 2002).

2.3. Extraction and purification of LPG

LPGs from parasites in early stationary phase were extracted in solvent E (H₂O/ethanol/diethyl ether/pyridine/NH₄OH; 15:15:5:1:0.017). The extract was dried by N₂ evaporation, resuspended in 0.1 N acetic acid/0.1 M NaCl, and applied to a column of phenyl-Sepharose (2 ml), equilibrated in the same buffer. LPG was eluted using solvent E (Orlandi and Turco, 1987).

2.4. Immunoblotting

Purified LPGs were transferred to nitrocellulose paper. The membrane was blocked (1 h) in 5% milk in PBS and probed for 1 h with monoclonal antibody (mAb) CA7AE (1:1,000), which recognizes the unsubstituted Gal(β1,4)Man repeat units (Tolson et al., 1989). After three 5-min washes in PBS, the membrane was incubated for 1 h with anti-mouse IgG conjugated with peroxidase (1:10,000) and the reaction was visualised using luminol.

2.5. Preparation of repeat units

Purified LPG was subjected to mild acid hydrolysis (0.02 N HCl, 5 min, 100 °C) to depolymerise the repeat units and cap structures. Water-soluble fractions were partitioned using 1-butanol and repeat units were desalted by passage through a two-layered column of AG50W-X12 (H⁺) over AG1-X8 (acetate) (Mahoney *et al.*, 1999).

2.6. Enzymatic treatments

Phosphorylated repeat units were treated with alkaline phosphatase in 15 mM Tris buffer, pH 9.0 (1 unit, 16 h, 37°C). Neutral oligosaccharides were treated with *E. coli* β -galactosidase in 80 mM Na₃PO₄, pH 7.3 (4 units, 16 h, 37°C) (Soares *et al.*, 2002).

2.7. Preparation of monosaccharides

The repeat units purified above were subjected to strong acid hydrolysis (2 N trifluoroacetic acid, 3h, 100 °C). Samples were desalted by passage through a two-layered column of AG50W-X12 (H⁺) over AG1-X8 (acetate) and subjected to FACE and HPLC.

2.8. Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE)

For repeat units, samples were fluorescently labeled with 0.05 N ANTS (8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfate) and 1 M cyanoborohydride (37°C, 16h). Monosaccharides were fluorescently labeled with 0.1 M AMAC (2-aminoacridone) in 5% acetic acid and 1 M cyanoborohydride. Sugars were subjected to FACE and the gel was visualised by a UV imager (Soares *et al.*, 2004).

2.9. Capillary electrophoresis (CE)

Dephosphorylated repeat units were labeled with 0.02 M APTS (8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt) in 15% acetic acid in sodium cyanoborohydride buffer and incubated overnight at 37 °C. Samples were run on CE with 25 kV for 20 min using reverse phase chromatography started with 10 sec and 5 psi pressure injection (Soares *et al.*, 2004).

2.10. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Monosaccharides were separated using a DX-500 HPLC (Dionex Corp.) with ED40 electrochemical detection. The samples were run on a CarboPac PA10 column (4 X 250mm) in the presence of 18 mM NaOH (flow rate 1 mL/min, 2000 psi). Glucose, galactose and mannose (100 µg/mL) were used as standards.

2.11. Purification of murine peritoneal macrophages, cell culture and NO measurements

Thioglycollate-elicited peritoneal macrophages were removed from C57BL/6 mouse by peritoneal washing and enriched by plastic adherence. Cells (5 X 10⁵ cells/well) were cultured at 37°C/5% CO₂ in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM glutamine, 50 U/mL of penicillin and 50 µg/mL streptomycin. They were kept in 96-well plates, primed with IFN-γ (100 IU/mL) (Kolodziej et al., 2008), incubated with parasites (10:1) and LPG (0.5 mM) purified from procyclic *Leishmania*. Culture supernatants were collected after 72h and nitrite concentrations were determined by Griess reaction (Drapier et al., 1988). All LPG and parasite incubations were performed in triplicate and in the presence of Polimixin B (50 µg/mL).

2.12. Sand fly infections

Lutzomyia longipalpis sand flies were captured in the Lapinha Cave, municipality of Lagoa Santa in a non-endemic area, Minas Gerais State, Brazil. The wild-caught sand flies were collected and fed on 30% sucrose solution for 3-5 day prior to ensure maturity for infection with a membrane glass-feeder device (Pimenta *et al.*, 1992). Heparinised mouse blood (37 °C) containing 4 X 10⁶ /mL logarithmic phase promastigotes (strains Ba262, PP75, BH46, IPT1 e EMO) was offered for 3 h under dark conditions. Blood engorged flies were separated and maintained at 26°C with 30% sucrose. The sand flies were anaesthetised with CO₂, their midguts dissected on days 2 and 6 post-infection. Guts were homogenised in 30 µl

PBS and the number of viable promastigotes determined by counting under a Neubauer improved haemocytometer.

2.13. Statistical analysis

The Shapiro-Wilk test was conducted to test the null hypothesis that the data are sampled from a Gaussian distribution (Shapiro and Wilk, 1965). The P value ($p > 0.05$) showed that the data did not deviate from Gaussian distribution. For this reason, student's T test and ANOVA were performed to test equality of population medians among groups and independent samples. Data were analysed by GraphPad Prism 4.0 software and $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Purification of LPG and characterisation of repeat units

The purified LPGs from all *L. infantum* strains (Table I) were recognised by the mAb CA7AE. In Figure 1, a representation including 13 strains is shown. Since the antibody recognizes Gal(β 1,4)Man unsubstituted repeat units in LPG, these results indicate at least some of the repeat units are indeed unsubstituted. For further structural information, the LPGs from all strains were depolymerised and purified phosphorylated repeat units were dephosphorylated with alkaline phosphatase and desalted prior to FACE analysis. Five selected *L. infantum* strains (PP75, EMO, BH46, Ba-262 and 268) showing each type of dephosphorylated repeat units are shown in Figure 2. Three profiles were observed: I) a disaccharide (most of the strains); II) a disaccharide and a trisaccharide (control strain PP75) (Soares et al., 2002) (Fig. 2A) and III) a disaccharide, trisaccharide, tetrasaccharide and pentasaccharide (strain BH46) (Fig. 2B). The disaccharide also comigrated with standard Gal(β 1,4)Man from *L. donovani* (1S-2D) (Fig. 2A) and was susceptible to β -galactosidase digestion in represented strain 268 (Fig. 2C), consistent with the basic structure of Gal(β 1,4)Man common to all LPGs. In our previous study (Soares et al., 2002), the trisaccharide (Fig. 2A) of PP75 LPG was susceptible to treatment with β -glucosidase indicating a β -glucose residue as side-chain.

3.2. Capillary electrophoresis and monosaccharide profiles

The proportion of each type of repeat unit from three representatives of the 16 *L. infantum* strains was determined by capillary electrophoresis (Fig. 3A-C) and the results confirmed the profiles observed in FACE (Fig. 2). In previously non-studied strains such as BH46, it was necessary to determine the identity of hexose (Hex) sugar branching-off the PO₄-Gal(β 1,4)Man backbone. This was accomplished after strong acid hydrolysis of the repeat units and FACE analysis of the individual monosaccharides only for strains bearing

type I and type III LPGs (EMO and BH46) (Fig. 4). The gel showed the expected banding profile for monosaccharides obtained from total acid hydrolysis of LPG from the *L. donovani* (1S-2D) control; two co-migrated together with galactose and mannose standards common to all repeat units. The relative proportion of Gal:Man does not appear to be equal by the FACE, but this is because a high proportion of PO₄-Gal is resistant to strong acid hydrolysis under the conditions used. Background levels of glucose were observed in the *L. infantum* strain EMO. Those were probably originated from the cap or glycan core during the mild acid hydrolysis in the initial steps of the purification of repeat units. However, a higher intense glucose band in the strain BH46 indicates that this sugar is presented in their side-chains.

3.3. High Performance Liquid Chromatography

To determine the proportion of sugars comprising the repeats of LPG, HPLC was performed from only two representatives of the 16 *L. infantum* strains (Fig. 5). Similar to what was observed in Figure 4, glucose peaks were observed in the strains EMO and BH46. However, in the BH46 strain, the Glc/Man ratios were higher than in the EMO strain (0.25 versus 0.13) confirming the presence of higher amounts of glucose (Fig. 5B-C).

3.4. Generalised structures of the LPGs from *L. infantum* strains

Collectively, the biochemical analysis of the LPG repeat units of all *L. infantum* strains is summarised in Table II and depicted in Fig. 6. The large majority of strains that were analysed possessed LPGs which had repeat units that were unsubstituted (88%), a characteristic of other species (i.e., *L. donovani* 1S-2D) that causes VL (Sacks et al., 1995). Among our tested strains, we found no other that was similar to our previously reported *L. infantum* strain PP75 (Soares et al., 2002) which possessed mostly unsubstituted Gal-Man repeats and some mono-glucosylated Gal-Man repeats. One strain (BH46) was significantly glucosylated as side chains in LPG repeats, containing up to 3 glucose residues.

3.4. Sand fly infections and Nitric Oxide production

Among the various parameters that could investigate the importance of the glucosylation of LPG repeat units, we chose to determine the survival of five representatives of the 16 *L. infantum* strains in sand fly vectors and their ability to elicit NO production by murine macrophages. *In vivo* midgut infections of the sand flies were determined on days 2 and 6. The reason for choosing those days was due to excretion of the blood meal on day 3. At this point, non-attached parasites are lost, followed by midgut re-colonisation by attached ones. No statistical differences in parasite densities from any of the *L. infantum* strains were observed ($P > 0.05$, Fig. 7). Upon stimulation with different parasite strains, respective LPGs and LPS, a higher NO production was observed compared to control (IFN- γ) by murine macrophages ($P < 0.0001$) (Fig. 8). There was no difference among live parasites using ANOVA ($p > 0.05$). On the other hand, using purified LPGs, ANOVA showed clear differences among all the five strains, where it seemed to have a trend in the glucosylated types II and III to trigger a higher NO production compared to type I ($p < 0.0001$). However, even within Type I group there was statistical difference among the three strains. For example, the NO production by Ba262 was statistically lower than the strains EMO and IPT1 ($p < 0.001$). The PP75 strain was the only one that was statistically different from all strains ($p < 0.0001$). This strain produced high levels of NO as the LPS control ($p > 0.05$). As expected, NO production by LPS was high and was inhibited by Polymixin B (not shown). No stimulation was observed in the absence of INF- γ either with parasites or LPG (not shown).

4. Discussion

Leishmania infantum is the causative agent of VL in the Old and New World and was first described by Nicolle in 1908. In the New world, *L. chagasi* was incriminated as the agent of VL for many years. However, immunological and molecular studies recognised those two species as the same (Maurício et al., 2000). Genetic variability of *L. infantum* from Europe, Africa, Asia and South America has been studied using different markers including: multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) (Chicharro et al., 2002; Pratlong et al., 2004; Campino et al., 2006; Kallel et al., 2008); random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Zemanová et al., 2004); multilocus microsatellite typing (MLMT) (Ochsenreither et al., 2006; Kuhls et al., 2007; Seridi et al. 2008a; Amro et al., 2009); PCR-based methods (Laurent et al., 2009); analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) (Kuhls et al., 2005); multilocus sequence typing (Maurício et al., 2006) and restriction fragment length polymorphism (RFLP-PCR) of kDNA minicircles (*kDNAPCR-RFLP* (Morales et al., 2001) and *cpb* and *gp63* genes (*cbp*- and *-gp63PCR-RFLP*) (Seridi et al., 2008b). This is the first study describing the intraspecific variability of *L. infantum* LPG, whose main polymorphisms reside in the side modifications of the conserved Gal(β 1,4)Man(α 1)-PO₄ backbone. In this work, the use of biochemical tools to compare different strains of *L. infantum* has increased our knowledge of *Leishmania* variability. Such variations were explored in the context of their interactions with the New World sand fly *L. longipalpis* and murine macrophages.

The LPGs of *Leishmania* have a conserved glycan core region, consisting of the structure Gal(α 1,6)Gal(α 1,3)Gal(β 1,3)[Glc(α 1)-PO₄]Man(α 1,3)Man(α 1,4)-GlcN(α 1). The lipid anchor is also conserved, characterized by a 1-*O*-alkyl-2-*lyso*-phosphatidylinositol containing either C₂₄ or C₂₆ as the aliphatic substituent (Orlandi and Turco, 1987). The repeat units and small oligosaccharide caps exclusively account for the polymorphism among *Leishmania* LPGs and have been shown to be the sites for parasite interactions with their vectors (Pimenta et al., 1992; 1994; Kamhawi et al., 2004). *Leishmania infantum* procyclic

LPG (strain PP75) has β -glucose residues in about one-third of the repeat units, while in the metacyclic phase a down-regulation of those sugars occurs (Soares et al., 2002). Glucose residues are commonly present in the side-chains in *L. mexicana*, *L. tropica* and *L. donovani* (India) (Ilg et al. 1992; McConville et al., 1995, Mahoney et al., 1999). On the other hand, *L. major* (FV1) has galactose and arabinose residues in its LPG (McConville et al., 1992), but not glucose. In this work, we reported for the first time, a panel of 16 *L. infantum* strains from Brazil, Africa and Europe. Based on our data, it was observed that the intraspecific polymorphism of *L. infantum* LPG is very low (Fig. 6). Most of the strains (88%) analysed either from the New or Old World was devoid of side chains and considered as type I. The PP75 strain previously studied, had a β -glucose substitution in the side-chain (Soares et al., 2002) and was considered a type II. Interestingly, the BH46 strain has up to three glucose side chains, a profile never observed in any LPG (type III). Oligo-glucosylation with 1-2 glucose residues side chains in LPG repeat units had been previously observed in *L. donovani* from India (Mahoney et al., 1999) and in the metacyclic forms of *L. braziliensis* (Soares et al., 2005). Those β -glucoses residues were suggested to have a role in the interactions of the parasite with the sand fly midgut in *Phlebotomus argentipes*, *L. longipalpis*, *Lutzomyia whitmani* and *Lutzomyia intermedia* (Mahoney et al., 1999; Soares et al., 2002; 2010). In *L. major*, β -galactose residues play a crucial role in midgut attachment in *Phlebotomus papatasi* (Kamhawi et al., 2004).

Here, we investigated if variations in the glucose residues in the LPGs would account for differences during in vivo midgut attachment of field captured *L. longipalpis* and in vitro NO synthesis by murine macrophages. The in vivo experiments with sand flies did not show any difference when using *L. infantum* parasites with different LPG types. Using different strains of *L. infantum* from Brazil and even one from Tunisia (IPT1), the parasite densities were high and were probably related to the ability of this sand fly to carry different species and/or strains. In our work, the LPGs from European and African parasites were

indistinguishable from most of the Brazilian *L. infantum* strains. The permissive nature of *L. longipalpis* could be related to its success in establishing the transmission of *L. infantum* after its introduction in South America (Myskova et al., 2007). Considerable discussion about the permissiveness of the vector *L. longipalpis* has been published (Volf and Miskova, 2007; Volf et al., 2008; Myskova et al., 2007), where mutants of *L. major* unable to synthesise LPG were able to sustain infection in this vector. This suggests that LPG was not crucial for development of those species in this sand fly. *Lutzomyia longipalpis* was susceptible to and sustained infection with a variety of pathogens from viruses to helminthes (reviewed in Soares and Turco, 2003). However, the LPG of *L. infantum* was able to bind to the sand fly midgut as previously shown (Soares et al., 2002). Generation of LPG mutants in *L. infantum* may help resolve the apparent discrepancy of the role and importance of LPG during the interaction with *L. longipalpis*. Although LPG has been shown to be a crucial molecule for parasite survival and establishment in the midgut, other molecules may also play a role in this process such as the proteophosphoglycans (PPGs) (Rogers et al. 2004). The existence of midgut glycoproteins bearing terminal N-acetylgalactosamine in permissive species was also suggested as a putative parasite ligand (Myskova et al., 2007). Nevertheless, regardless of the type of LPG, *L. longipalpis* was able to sustain infection with all the *L. infantum* strains tested.

A similar trend was observed while using live parasites in the interaction with macrophages. Although parasites were able to trigger NO production in the presence of INF- γ , no difference was observed with all the *L. infantum* strains tested. Similarly, Gantt *et al.* (2001) demonstrated the role of O₂⁻ and NO in the intracellular killing of the parasite in human and murine macrophages infected with intracellular *L. infantum*. Using *L. major* LPG and sPGs, Proudfoot et al. (1996) showed that those glycoconjugates were able to stimulate NO production when co-stimulated with IFN- γ , and this regulatory effect was dependent on the glycan portion of LPG. Similarly, our data using INF- γ primed murine macrophages

showed that NO production was variable among all strains and also within a group such as the LPG Type I. Interestingly, a higher NO production was observed in glucosylated type II LPG compared to all strains. This is in agreement with previous observations of Proudfoot et al. (1996), where more complex PGs structures elicited a higher NO production in *L. major*. Since the lipid moiety is conserved among *Leishmania* species and has agonistic activity for TLR2 (Becker *et al.*, 2003; de Veer *et al.*, 2003), the role of the glycan part is also crucial for NO production. Although those preliminary data indicate a trend in the glucosylated type II and perhaps III to elicit a higher NO production, still, a clear correlation between virulence in LPG structure could not be determined and are probably strain specific. However, the role of other molecules could also be modulating NO production together with LPG. Based on the LPG characteristics from New and Old World *L. infantum*, our biochemical data is in accordance with molecular data indicating that *L. chagasi* and *L. infantum* are the same species.

Acknowledgements

R.P.P. Soares is a research fellow supported by CNPq (#305008/2007-2, #472699/2007-5 and #471465/2009-7), TDR-WHO (ID A50880) and FAPEMIG APQ-3726-4.01/07. P.F.P. Pimenta, M. N. Melo are a research fellows supported by CNPq and S. J. Turco is supported by NIH Grant AI31078. J. M. Coelho-Finamore and V. C. Freitas are supported by CPqRR. R. R. Assis is supported by FAPEMIG. We thank Dr. Elisa Cupollilo from Oswaldo Cruz Institute Leishmania collection (CLIOC), Dr. Vanete Thomaz-Soccol (Laboratory of Molecular Parasitology, UFPR) for providing some strains used in this work and Tamara Barron for performing the CE analyses. This project was approved by the Ethical Committee of Animal Handling (CEUA) from FIOCRUZ (Protocol P-0297-06).

1. References

- Alexander, J., Satoskar, A.R., Russell, D.G. 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J. Cell. Sci.* 112 Pt 18, 2993-3002.
- Amro, A., Schönian, G., Al-Sharabati, M.B., Azmi, K., Nasereddin, A., Abdeen, Z., Schnur, L.F., Baneth, G., Jaffe, C.L., Kuhls, K. 2009. Population genetics of *Leishmania infantum* in Israel and the Palestinian Authority through microsatellite analysis. *Microb. Infect.* 11, 484-92.
- Ashford, R.W. 2000. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30, 1269-1281.
- Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L.G., Ruiz, A., Cervantes, R., Torres, A.P., Cabrera, N., González, A., Maldonado, C., Isibasi, A. 2003. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol. Biochem. Parasitol.* 130, 65-74.
- Brittingham, A., Mosser, D.M. 1996. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol. Today* 12, 444-447.
- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J.A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Cortes, S., Ramada, J., Cristovão, J.M., Afonso, M.O., Dedet, J.P. 2006. Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Trop. Med. Int. Health* 11, 1708-1714.
- Chicharro, C., Jiménez, M.I., Alvar, J. 2002. Iso-enzymatic variability of *Leishmania infantum* in Spain. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 97, S57-S64.
- Descoteaux, A., Turco, S.J. 2002. Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microb. Infect.* 4, 975-981.
- de Veer, M.J., Curtis, J.M., Baldwin, T.M., Didonato, J.A., Sexton, A., McConville, M.J., Handman, E., Schofield, L. 2003. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*:

possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur. J. Immunol.* 33, 2822-2831.

Dobson, D.E., Mengeling, B.J., Cilmi, S., Hickerson, S., Turco, S.J., Beverley, S.M. 2003. Identification of genes encoding arabinosyltransferases (SCA) mediating developmental modifications of lipophosphoglycan required for sand fly transmission of *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* 278, 28840-28848.

Drapier, J.C., Wietzerbin, J., Hibbs, J.B. 1988. Interferon- γ and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* 18, 1587-1592.

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. 2001. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J. Immunol.* 167, 893-901.

Giorgione, J.R., Turco, S.J., Epand, R.M. 1996. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11634-11639.

Grimaldi, G., Tesh, R., McMahon-Pratt, D. 1989. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41, 687-725.

Guimarães-Costa, A.B., Nascimento, M.T., Froment, G.S., Soares, R.P., Morgado, F.N., Conceição-Silva, F., Saraiva, E.M. 2009. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 6748-6753.

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

Ilg, T., Etges, R., Overath, P., McConville, M.J., Thomas-Oates, J., Thomas, J., Homans, S.W. 1992. Structure of *Leishmania mexicana* Lipophosphoglycan. *J. Biol. Chem.* 267, 6834-6840.

Kallel, K., Pratlong, F., Haouas, N., Kaouech, E., Belhadj, S., Anane, S., Dedet, J.P., Babba, H., Chaker, E. 2008. Isoenzymatic variability of *Leishmania infantum* in Tunisia concerning 254 human strains. *Acta Trop.* 106, 132-136.

Kamhawi, S., Ortigao, M.R., Pham, V.M., Kumar, S., Lawyer, P.G., Turco, S.J., Mury, C.B., Sacks, D.L., Venzuela, J.G. 2004. A Role for Insect Galectins in Parasite survival. *Cell* 119, 329-341.

Kolodziej, H., Radtke, O.A., Kiderlen, A.F. 2008. Stimulus (polyphenol, IFN- γ , LPS)-dependent nitric oxide production and antileishmanial effects in RAW 264.7 macrophages. *Phytochem.* 69, 3103–3110.

Kuhls, K., Mauricio, I.L., Pratlong, F., Presber, W., Schönian, G. 2005. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microb. Infect.* 7, 1224-1234.

Kuhls, K., Keilonat, L., Ochsenreither, S., Schaar, M., Schweynoch, C., Presber, W., Schönian, G. 2007. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microb. Infect.* 9, 334-343.

Laurent, T., Van der Auwera, G., Hide, M., Mertens, P., Quispe-Tintaya, W., Deborggraeve, S., De Doncker, S., Leclipteux, T., Bañuls, A.L., Büscher, P., Dujardin, J.C. 2009. Identification of Old World *Leishmania* spp. by specific polymerase chain reaction amplification of cysteine proteinase B genes and rapid dipstick detection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 63, 173-181.

Lukes, J., Mauricio, I.L., Schönian, G., Dujardin, J.C., Soteriadou, K., Dedet, J.P., Kuhls, K., Tintaya, K.W., Jirků, M., Chocholová, E., Haralambous, C., Pratlong, F., Oborník, M., Horák, A., Ayala, F.J., Miles, M.A. 2007. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 9375-9380.

- Mahoney, A.B., Sacks, D.L., Saraiva, E., Modi, G., Turco, S.J. 1999. Intra-species and stage-specific polymorphisms in LPG control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. *Biochemistry* 38, 9813-9823.
- Mauricio, I.L., Stothard, J.R., Miles, M.A. 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16, 188-189.
- Mauricio, I.L., Yeo, M., Baghaei, M., Doto, D., Pratlong, F., Zemanova, E., Dedet, J.P., Lukes, J., Miles, M.A. 2006. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *Int. J. Parasitol.* 36, 757-769.
- McConville, M.J., Thomas-Oates, J.E., Ferguson, M.A., Homans, S.W. 1990. Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* 265, 19611-19623.
- McConville, M.J., Turco, S.J., Ferguson, M.A.J., Sacks, D.L. 1992. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J.* 11, 3593-3600.
- McConville, M.J., Schnur, L.F., Jaffe, C., Schneider, P. 1995. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem. J.* 310, 807-818.
- Morales, M.A., Chicharro, C., Ares, M., Cañavate, C., Barker, D.C., Alvar, J. 2001. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95, 104-107.
- Myskova, J., Svobodova, M., Beverley, S.M., Volf, P. 2007. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microb. Infect.* 9, 317-324.
- Ochsenreither, S., Kuhls, K., Schaar, M., Presber, W., Schönian, G. 2006. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *J. Clin. Microbiol.* 44, 495-503.

Orlandi, P.A., Turco, S.J. 1987. Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. J. Biol. Chem. 262, 10384-10391.

Pimenta, P.F.P., Turco, S.J., McConville, M.J., Lawyer, P.G., Perkins, P., Sacks, D.L 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. Science 234, 212-214.

Pimenta, P.F.P., Saraiva, E.M., Rowton, E., Modi, G.B., Garraway, L.A., Beverley, S.M., Turco, S.J., Sacks, D.L 1994. Evidence that vectorial competence of phlebotomine sandflies for different species is controlled by structural polymorphisms in the surface of lipophosphoglycan. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91, 9155-9159.

Pratlong, F., Rioux, J.A., Marty, P., Faraut-Gambarelli, F., Dereure, J., Lanotte, G., Dedet, J.P. 2004. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. J. Clin. Microbiol. 42, 4077-4082.

Proudfoot, L., Nikolaev, A.V., Feng, G., Wei, X., Ferguson, M.A.J., Brimacombe, J.S., Liew, F.Y. 1996. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10984-10989.

Ready, P.D 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. Euro. Surveill. 15, p11=19505.

Rogers, M.E., Ilg, T., Nikolaev, A.V., Ferguson, M.A., Bates, P.A. 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. Nature 430, 463-467.

Sacks, D.L., Pimenta, P.F.P., McConville, M.J., Schneider, P., Turco, S.J. 1995. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. J. Exp. Med. 181, 685-697.

- Seridi, N., Amro, A., Kuhls, K., Belkaid, M., Zidane, C., Al-Jawabreh, A., Schönian, G. 2008a. Genetic polymorphism of Algerian *Leishmania infantum* strains revealed by multilocus microsatellite analysis. *Microb. Infect.* 10, 1309-1315.
- Seridi, N., Belkaid, M., Quispe-Tintaya, W., Zidane, C., Dujardin, J.C. 2008b. Application of PCR-RFLP for the exploration of the molecular diversity of *Leishmania infantum* in Algeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 556-563.
- Shapiro, S.S., Wilk, M.B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52, 591-611.
- Soares, R.P., Macedo, M.E., Ropert, C., Gontijo, N.F., Almeida, I.C., Gazzinelli, R.T., Pimenta, P.F., Turco, S.J. 2002. *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 121, 213-224.
- Soares, R.P., Cardoso, T.L., Barron, T., Araújo, M.S., Pimenta, P.F., Turco, S.J. 2005. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *Int. J. Parasitol.* 35, 245-253.
- Soares, R.P., Barron, T., McCoy-Simandle, K., Svobodova, M., Warburg, A., Turco, S.J. 2004. *Leishmania tropica*: intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by different *Phlebotomus* species. *Exp. Parasitol.* 107, 105-114.
- Soares, R.P., Margonari, C., Secundino, N.F., Macedo, M.E., da Costa, S.M., Rangel, E.F., Pimenta, P.F., Turco, S.J. 2010. Differential midgut attachment of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the sand flies *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* and *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*. *J. Biomed. Biotechn.* 2010, Article ID 439174, 7 pages.
- Soares, R.P.P., Turco, S.J., 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *Ann. Braz. Acad. Sci.* 75, 301–330.

- Tolson, D.L., Turco, S.J., Beecroft, R.P., Pearson, T.W. 1989. The immunochemical structure and surface arrangement of *Leishmania donovani* lipophosphoglycan determined using monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 35, 109-118.
- Turco, S.J., Descoteaux, A. 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 65–94.
- Volf, P., Myskova, J. 2007. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends Parasitol.* 23, 91–92.
- Volf, P., Hostomska, J., Rohousova, I. 2008. Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. *Parasite* 15, 237-243.
- Zemanová, E., Jirků, M., Mauricio, I.L., Miles, M.A., Lukes, J. 2004. Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 613-617.

Figure legends

Fig. 1. Immunoblotting of purified LPG (10 µg per lane) from *L. infantum* strains probed with the antibody CA7AE (1:1,000). Data are a representation of 13 of the 16 strains analysed. Detailed information about the strains is described in Table 1.

Fig. 2. Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE) of LPG repeat units. Panel A, FACE analysis of controls: Lanes 1, oligoglucose ladder represented by G₂-G₅; lane 2, *L. donovani* (1S-2D); lane 3, *L. infantum* PP75 (Soares et al., 2002). Panel B, FACE analysis of *L. infantum* strains: lane 2, *L. infantum* (EMO); lane 3, *L. infantum* BH46; lane 4, *L. infantum* Ba262; Panel C, FACE analysis of dephosphorylated repeat units of *L. infantum* (strain 268) treated with β-galactosidase: lane 2, repeat unit untreated (-); lane 3, repeat unit treated with β-galactosidase (+). Number in parentheses represents the types of repeat unit: (I) No side chains, disaccharides; (II), side chains with one residue, trisaccharides and (III), side chains with more than one residue, tetra and pentasaccharides. Man – mannose, Gal – galactose, Glc – glucose, Hex – hexose and Mono - monosaccharides.

Fig. 3. Capillary electrophoresis (CE) analysis of repeat units. Panel A, *L. infantum* (Ba262) (type I); Panel B, *L. infantum* (PP75) (type II) and Panel C, *L. infantum* (BH46) (type III). Mono – monosaccharides, di – disaccharides, tri – trisaccharides, tetra – tetrasaccharides and penta – pentasaccharides.

Fig. 4. Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE) of monosaccharides from polymorphic LPG repeat units after strong acid hydrolysis. Lane 1, standards sugars; lane 2, Control strain *L. donovani* (1S-2D); lane 3, *L. infantum* (EMO) and lane 4, *L. infantum* (BH46). Man – mannose, Gal – galactose, Glc – glucose.

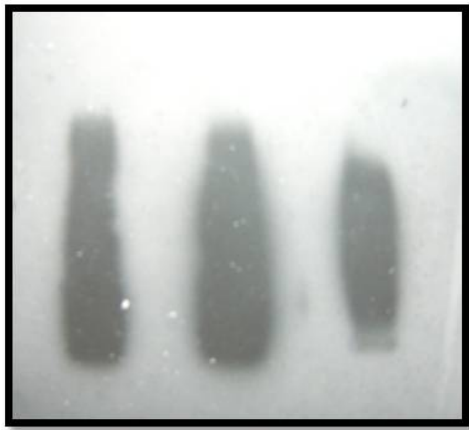
Fig. 5. High performance liquid chromatography of monosaccharides. Panel A, controls D-mannose, D-galactose and D-glucose (100 mg/mL); Panel B, monosaccharides from repeat units of *L. infantum* (EMO); Panel C, monosaccharides from repeat units of *L. infantum* (BH46). Man – mannose, Gal – galactose, Glc – glucose.

Fig. 6. Schematic diagram of different types of LPG (I, II and III) from Old and New World *L. infantum* strains. The structure of the glycan core is Gal(α 1,6)Gal(α 1,3)Gal_n(α 1,3)[Glc(α 1-PO₄)-6]-Man(α 1,3)Man(α 1,4)GlcN(α 1,6) linked to 1-*O*-alkyl-2-*lyso*-phosphatidylinositol anchor. The repeat units are 6-Gal(β 1,4)Man(α 1)-PO₄. The precise locations of the Glc side chains in the repeat unit domain are not known.

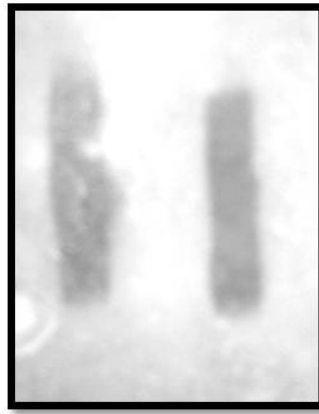
Fig. 7. Parasite densities in the midgut of *L. longipalpis* artificially fed with *L. infantum* (strains Ba262, EMO, IPT1, PP75 and BH46) exhibiting different LPG types (I, II and III). 2d, 2 days post-feeding; 6d, 6 days post-feeding. Results are the representation of two experiments.

Fig. 8. Nitric oxide production by C57BL/6 mouse macrophages primed with IFN- γ (100 IU/mL) upon stimulation with live parasites (1:10), lipophosphoglycan (LPG) (0.5 mM) from *L. infantum* (strains Ba262, EMO, IPT1, PP75 and BH46) exhibiting different LPG types (I, II and III) and Lipopolysaccharide (LPS) (100 ng/mL). P <0.05 is considered significant. * indicates ANOVA, ** indicates “t” test. Results are the representation of three experiments.

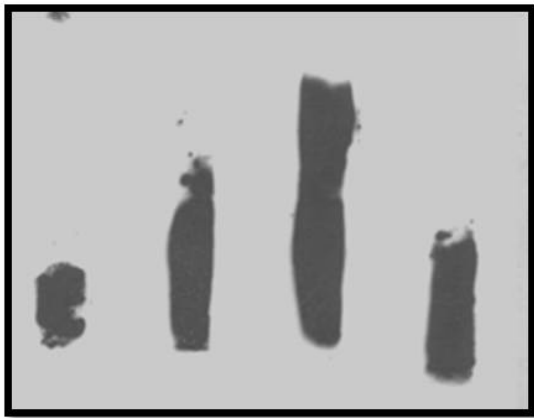
Fig. 1.



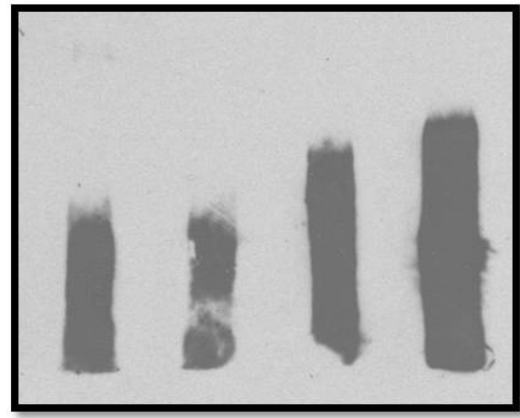
957 Pharoah 268



2566 EMO



640 269 211 254



Ba262 PP75 EMO BH46

Fig. 2

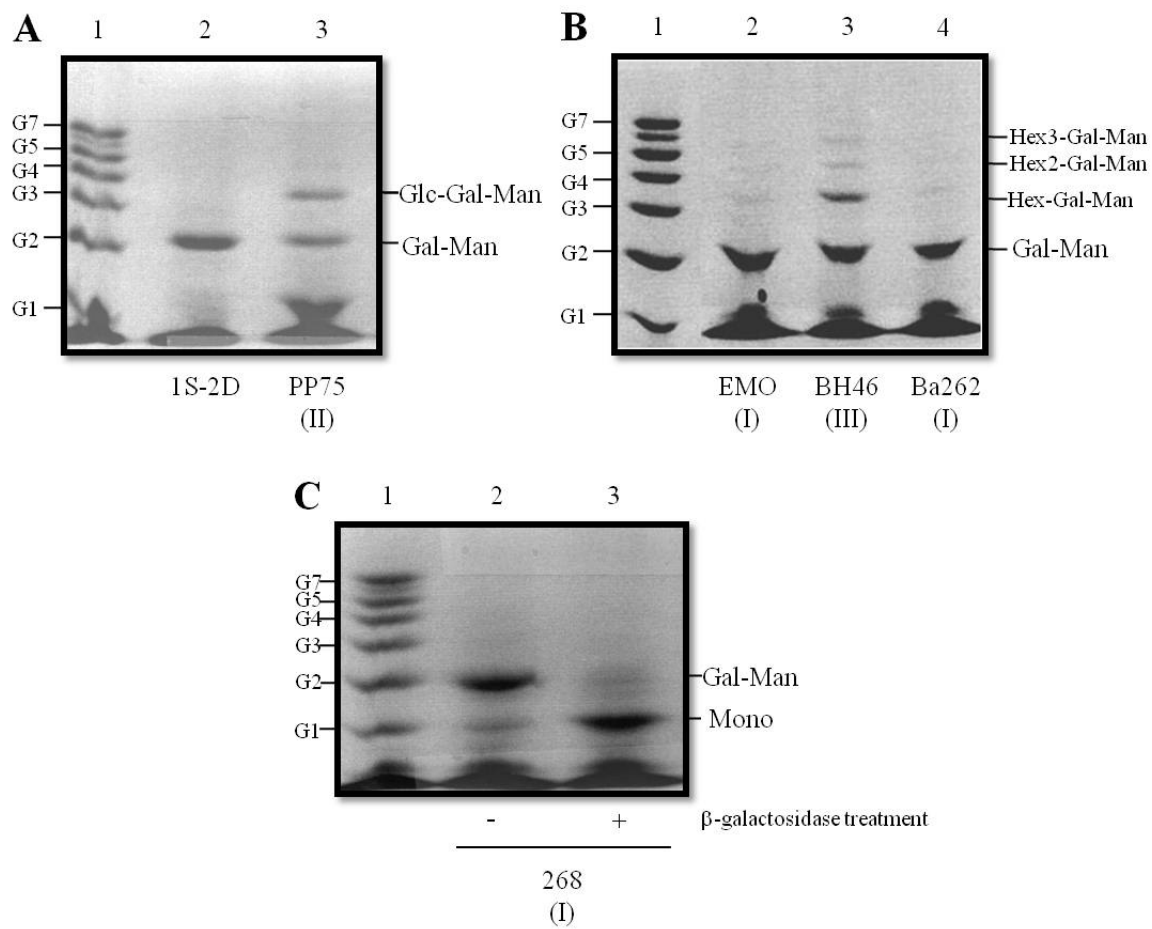
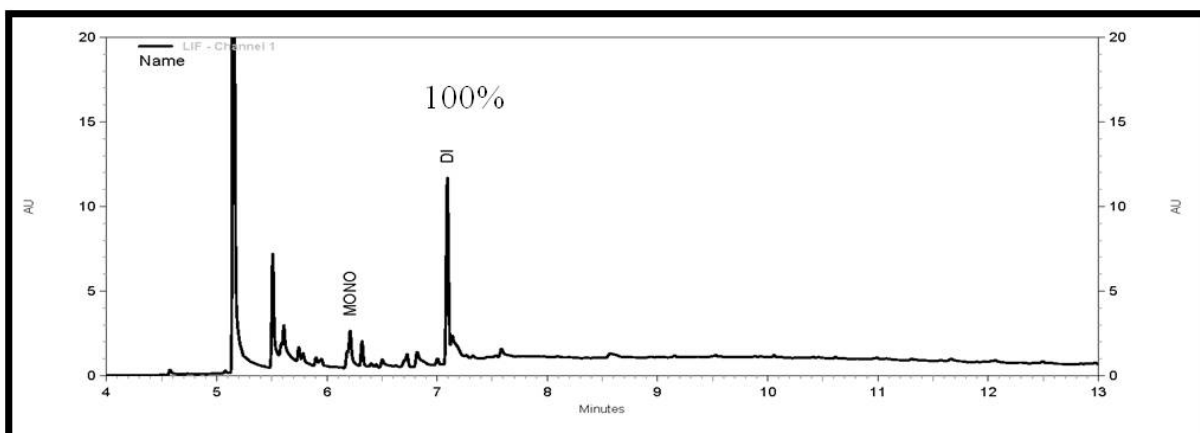
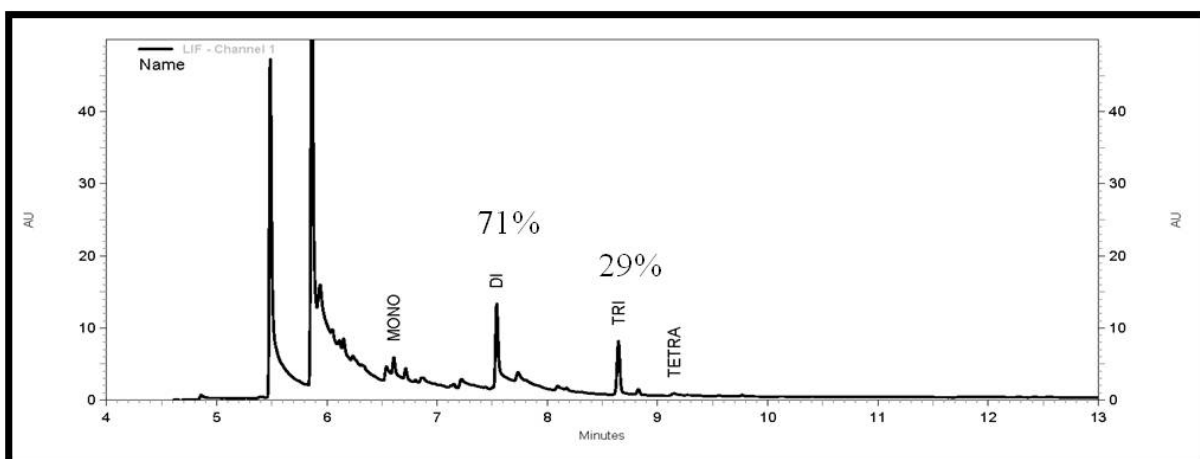


Fig. 3.

A) *L. infantum* (Ba262–type I)



B) *L. infantum* (PP75–type II)



C) *L. infantum* (BH46–type III)

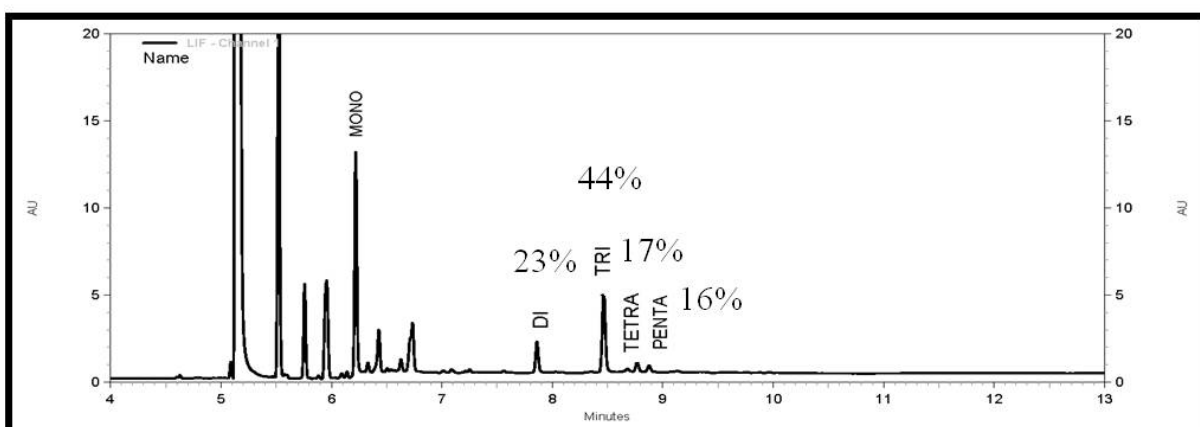


Fig. 4.

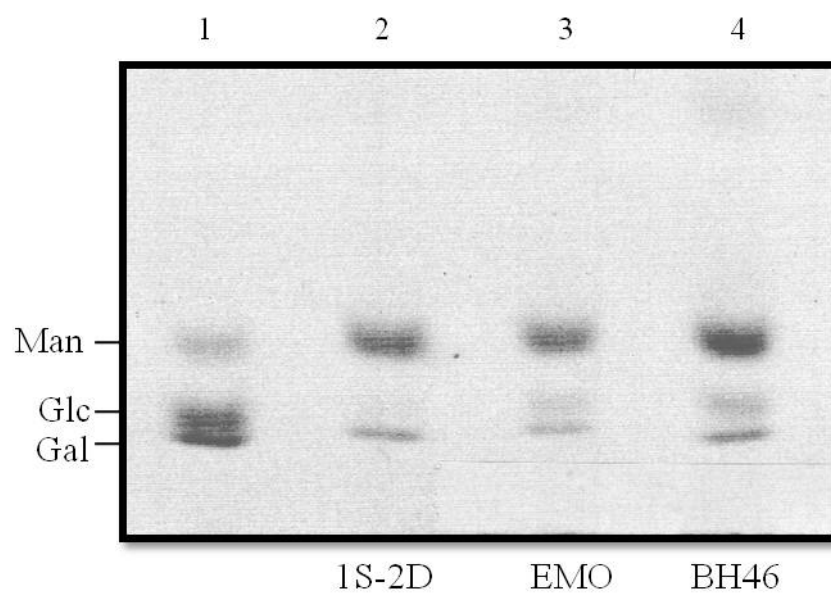


Fig. 5.

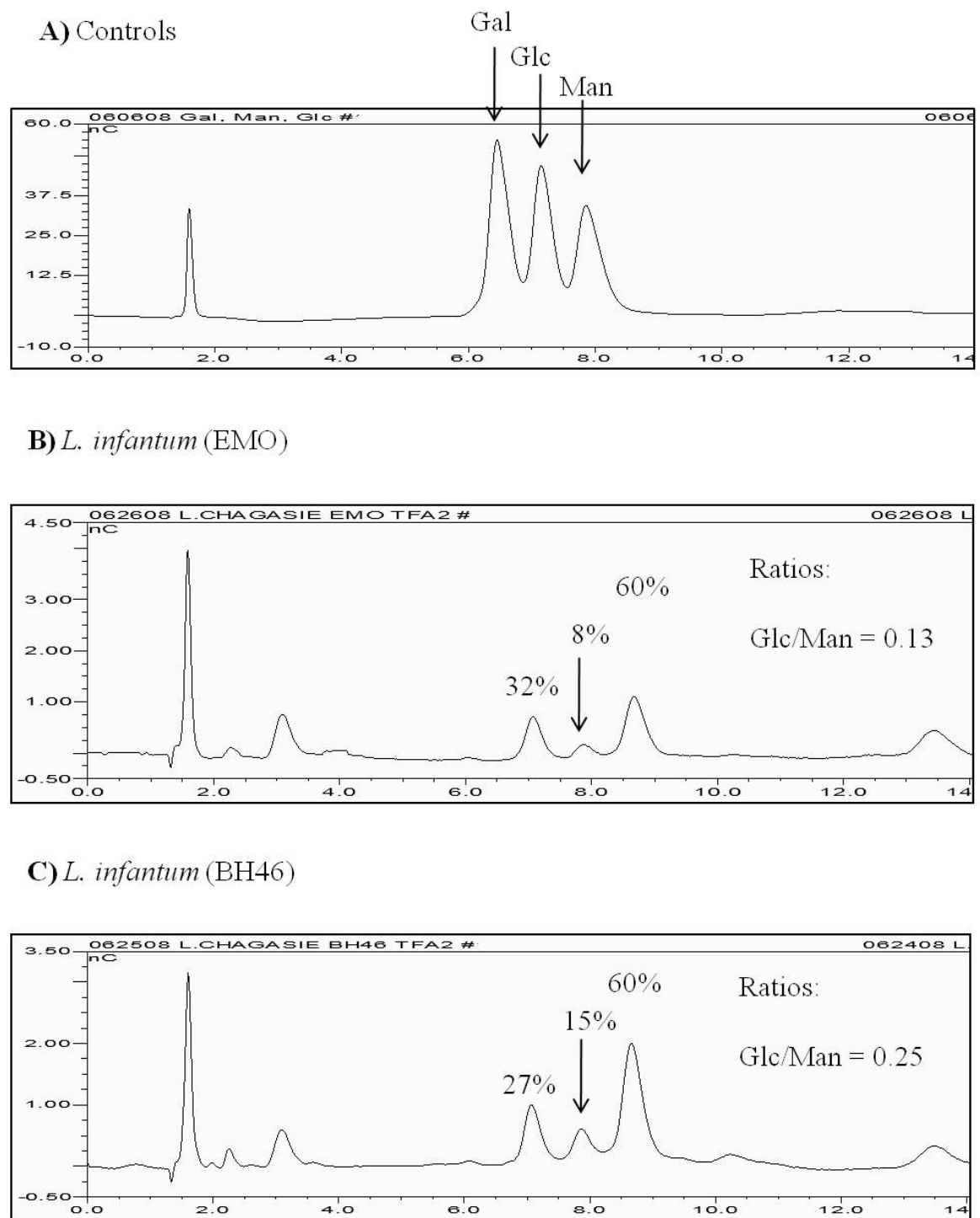


Fig. 6.

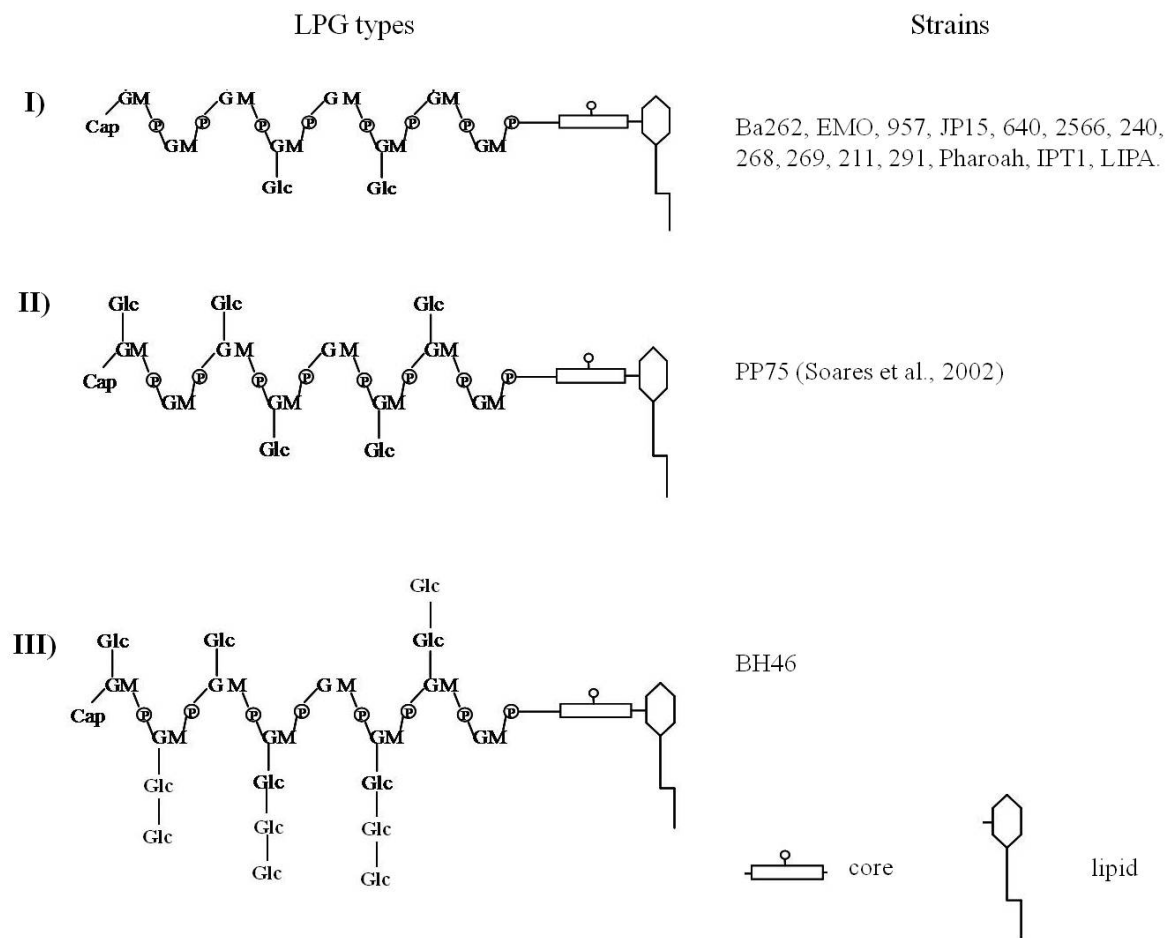


Fig. 7

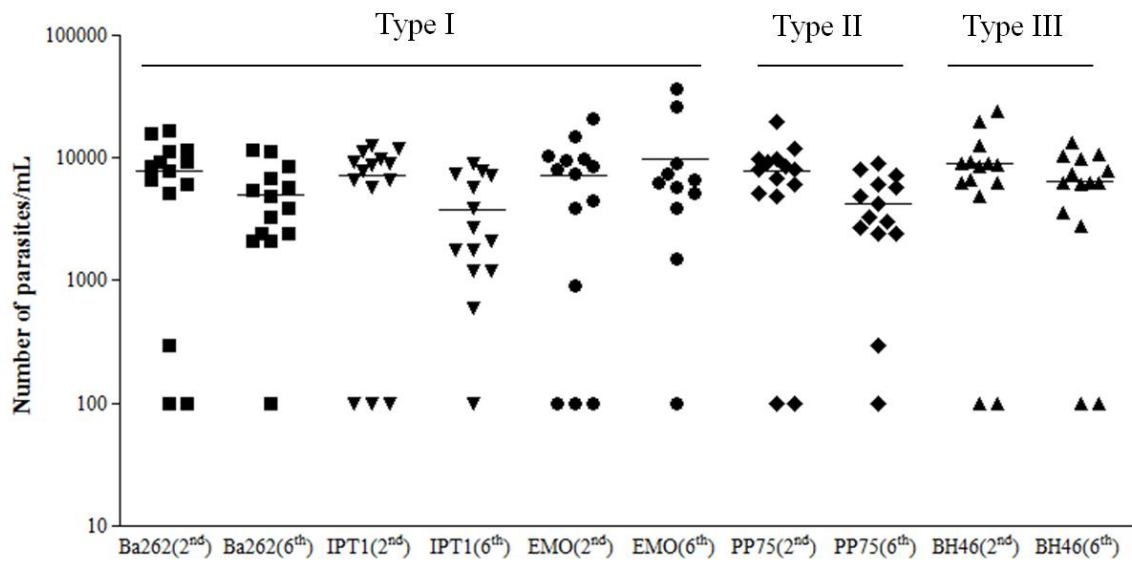


Fig. 8.

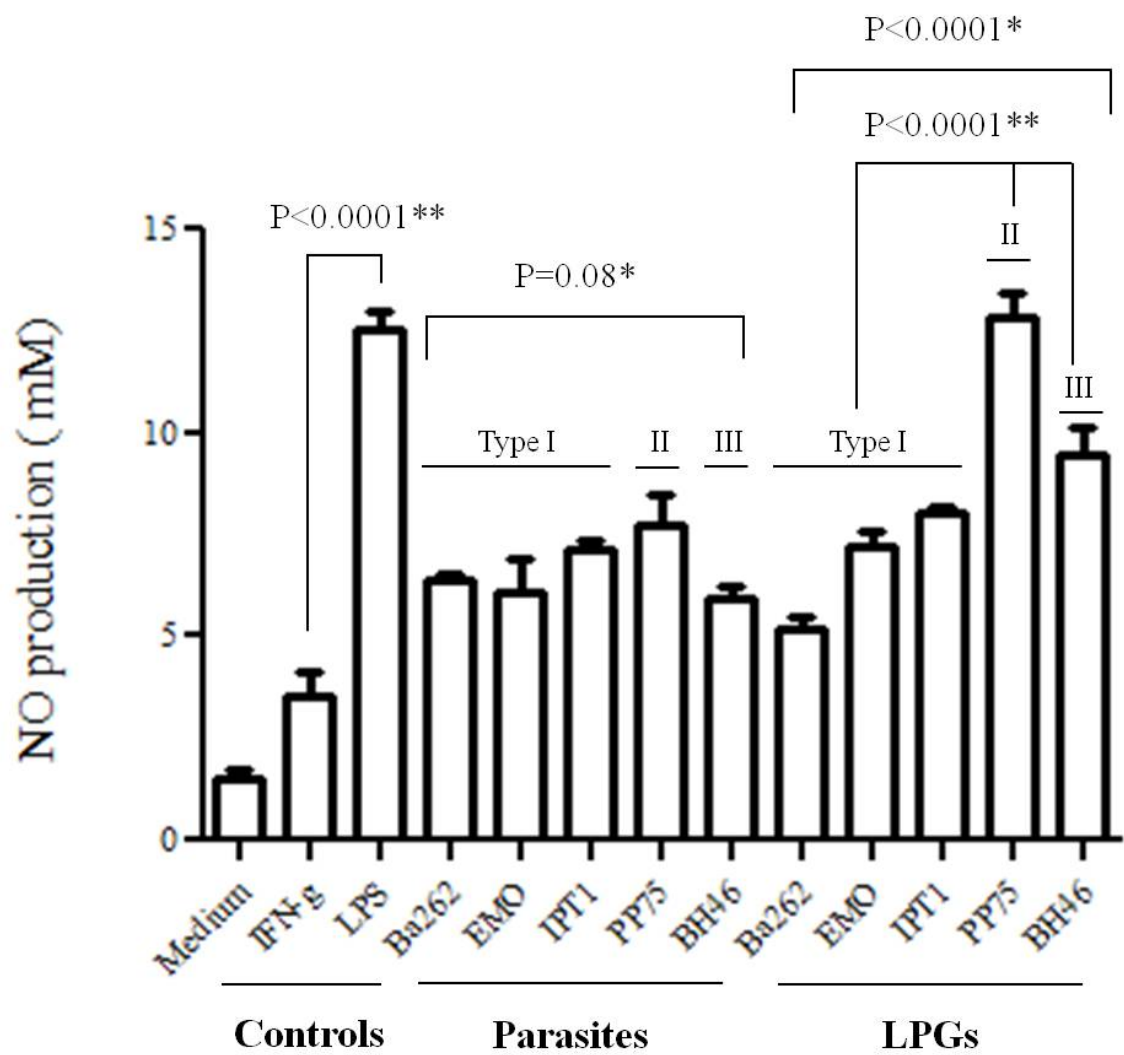


Table 1Strains of *Leishmania infantum* analyzed in this study.

Strains <i>L. infantum</i> (<i>L. chagasi</i>) ^a	Denomination used in the text	Clinical pattern ^c	Origin (city/state ^b /country)
MHOM/BR/74/PP75*	PP75	VL	Icatu/BA/Brazil
MHOM/BR/70/BH46	BH46	VL	Conselheiro Pena/MG/ Brazil
MCAN/BR/89/Ba-262	Ba262	CanL	Jacobina/BA/Brazil
MHOM/BR/2001/HP-EMO	EMO	VL	Pancas/ES/Brazil
MHOM/BR/1987/HCO-1	957	VL	ND/ES/Brazil
MCAN/BR/99/JP15	JP15	CanL	João Pessoa/PB/Brazil
MHOM/BR/1985/GS	640	VL	ND/BA/Brazil
MHOM/BR/2003/MMF	2566	VL	Cipolândia/MS/Brazil
240 (dog/BR/ND)	240	CanL	Belo Horizonte/MG/Brazil
291 (ND/BR/ND)	291	ND	Aracaju/SE/Brazil
MCAN/BR/2004/CUR268	268	CanL	Belo Horizonte/MG/Brazil
MCAN/BR/2004/CUR269	269	CanL	Belo Horizonte/MG/Brazil
MCAN/BR/2003/CUR211	211	CanL	Belo Horizonte/MG/Brazil
MCAN/FR/1982/PHAROAH	Pharoah	CanL	ND*/France
MHOM/TU/1980/IPT1	IPT1	VL	ND/Tunisia
MCAN/AL/1983/LIPA116	LIPA	CanL	ND/Algeria
<i>L. donovani</i> MHOM/SD/00/1S-2D*	1S-2D	VL	ND/Sudan

^a The World Health Organization (WHO) code is as follows: host (MHOM, *Homo sapiens*; MCAN, *Canis familiaris*)/country/year of isolation/name of strain.

^b Brazilian states: MG, Minas Gerais; BA, Bahia; PB, Paraíba; MS, Mato Grosso do Sul; ES, Espírito Santo; SE, Sergipe.

^c VL, visceral leishmaniasis, CanL, canine leishmaniasis, ND, not determined.

* Strains of *L. infantum* (PP75) and *L. donovani* (1S-2D) were used as controls.

Table 2Repeat unit profiles of *Leishmania infantum* lipophosphoglycans*.

Strain	LPG type	Di	Tri	Tetra	Penta
Ba262	1	100%	--	--	--
PP75	2	71%	29%**	--	--
BH46	3	23%	44%**	17%**	16%**
EMO	1	100%	--	--	--
957	1	100%	--	--	--
JP15	1	100%	--	--	--
640	1	100%	--	--	--
2566	1	100%	--	--	--
240	1	100%	--	--	--
268	1	100%	--	--	--
269	1	100%	--	--	--
211	1	100%	--	--	--
291	1	100%	--	--	--
Pharoah	1	100%	--	--	--
IPT1	1	100%	--	--	--
LIPA	1	100%	--	--	--

Legend: Di – disaccharide; Tri – trisaccharide; Tetra – tetrasaccharide; Penta – pentasaccharide. * – Determined using capillary electrophoresis. ** - side-chains are composed of glucose residues according to fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis and high performance liquid chromatography.

9 Referências Bibliográficas

- Alexander B, Maroli M. Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol* 2003;17: 1-18.
- Ashford, RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 2000; 30: 1269-81.
- Bates PA, Rogers ME. New insights into developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med* 2004; 4(6): 601-9.
- Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrilo-Carrasco N, Kobeh LG, *et al.* *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 130: 65-74.
- Bogdan C, Rollinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* 1998; 28: 121-34.
- Borja-Cabrera GP, Pontes NNC, da Silva VO, de Souza EP, Santos WR, Gomes ER, *et al.* Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilAsaponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine* 2002; 20: 3277-84.
- Borovsky D, Schlein Y. Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. *Med Vet Entomol* 1987; 1(3): 235-42.
- Butcher BA, Turco SJ, Hiltys BA, Pimenta PF, Panunzio M, Sacks DL, *et al.* Deficiency in β 1,3-galactosyltransferase of a *Leishmania major* lipophosphoglycan mutant adversely influences the *Leishmania*-sandfly interaction. *J Biol Chem* 1996; 271(34): 20573-9.
- Cunha AM, Chagas E. New species of Protozoa of the Genus *Leishmania* pathogenic to man *Leishmania chagasi* sp previous note. *Hospital* 1937; 11: 1-6.
- Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol* 2002; 72: 132-41.
- Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of the New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50(3): 296-311.

Cupolillo E, Momen H, Grimaldi Jr G. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998; 93(5): 663–8.

Dantas-Torres F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101(1): 117-8.

Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral Leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2006; 48(3): 151-6.

Davidson RN. Leishmaniasis. Medicine 2005; 33(8): 1-3.

Descoteaux A, Turco SJ. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. Biochim Biophys Acta 1999; 1455: 341-52.

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

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

De Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, Didonato JA, Sexton A, McConville MJ, *et al.* MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. Eur J Immunol 2003; 33: 2822-31.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal Chem 1956; 28(3): 350-6.

Feng GJ, Goodridge HS, Harnett MM, Wei XQ, Nikolaev AV, Higson AP, *et al.* Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: *Leishmania* phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. J Immunol 1999; 163: 6403-12.

Freitas, VC. O processo de interação de *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* com *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* e a importância do lipofosfoliglicano (LPG). Belo Horizonte: s.n., 2010. 210 p. Capa dura, 30 cm, il., tabs.. Tese (Doutorado em Ciências na área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias).- Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Disponível em: < http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/T_19.pdf >. Acesso em: 28 nov. 2010.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol 2004; 7(3): 338-49.

Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jeronimo SMB, Nascimento ET, *et al.* Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. J Immunol 2001; 167: 893-901.

Grimaldi G Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of Leishmaniasis in the New World. Am J Trop Med Hyg 1989; 41(6): 687-725.

Hermont VJ. Manual Técnico Leishtec: Vacina recombinante contra leishamiose visceral canina. Belo Horizonte: UFMG/Hertape Calier Saúde Animal, 2008. 78 p. Disponível em: <http://www.hertapecalier.com.br/site/empresa/?tp=32&site=1&secao=2&produto_id=64>. Acesso em: 18 nov. 2010.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. Lancet 1999; 354(9185):1191-9.

Ilg T, Etges R, Overath P, McConville MJ, Oates JT, Thomas J, *et al.* Structure of *Leishmania mexicana* Lipophosphoglycan. J Biol Chem 1992; 267(10): 6834-40.

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

Kamhawi S, Modi GB, Pimenta PF, Rowton E, Sacks DL. The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. Parasitol 2000; 121(Pt1): 25-33.

Kamhawi S, Ramalho-Ortigao M, Pham VM, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, *et al.* A Role for Insect Galectins in Parasite survival. Cell 2004; 119: 329-41.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of Leishmaniasis: a review. Med Vet Entomol 1990; 4(1): 1-24.

Kuhls K, Keilonat L, Ochsenreither S, Schaar M, Schweynoch C, Presber W, *et al.* Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. Microb Infect 2007; 9: 334-43.

Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100(8): 811-27.

Lainson R, Shaw, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editores. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. London: Academic Press; 1987. P.1-120.

Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol* 2003; 11(5): 210-5.

Lawyer PG, Ngumbi PM, Anjili CO, Odongo SO, Mebrahtu YB, Githure JJ, *et al.* Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Phlebotomidae). *Am Trop Med Hyg* 1990; 43(1): 31-43.

Lodge R, Descoteaux A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clin Immunol* 2005; 114: 256-65.

Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(22): 9375-80.

Mahoney AB, Sacks DL, Saraiva E, Modi G, Turco SJ. Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. *Biochem* 1999; 38(31): 9813-23.

Marques MJ, Volpini AC, Machado-Coelho GL, Machado-Pinto J, da Costa CA, Mayrink W, *et al.* Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis: diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. *Diag Microbiol Infect Dis* 2006; 54(1): 37-43

Matlashewski G. *Leishmania* infection and virulence. *Med Microbiol Immunol* 2001; 190(1-2): 37-42.

Maurício IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 2000; 16(5): 188-9.

Maurício IL, Gaunt MW, Stothard JR, Miles MA. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitol* 2001; 122: 393-403.

McConville MJ, Thomas-Oates JE, Ferguson MAJ, Homans SW. Structure of lipophosphoglycan from *Leishmania major*. *J Biol Chem* 1990; 265(32): 19611-23.

McConville MJ, Turco SJ, Ferguson MAJ, Sacks DL. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *Eur Mol Biol Organ J* 1992; 11(10): 3593-3600.

McConville MJ, Schnur LF, Jaffe C, Schneider P. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem J* 1995; (310): 807-18.

Mimori T, Sasaki J, Nakata M, Gomez EA, Uezato H, Nonaka S. Rapid identification of *Leishmania* species from formalin-fixed biopsy samples by polymorphism-specific polymerase chain reaction. *Gene* 1998; 21(2): 179-86.

Moore EM, Lockwood DN. Treatment of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 2010; 2(2): 151-8.

Morales MA, Chicharro C, Ares M, Cañavate C, Barker DC, Alvar J. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 104-7.

Myskova J, Svobodova M, Beverley SM, Volf P. A lipophosphoglycan – independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes Infect* 2007; 9: 317-24.

Nicolle CJ. Sur trois cas d'infection splénique infantile à corps de *Leishman* observés en Tunisie. *Arch Inst Pasteur Tunis* 1908; 3:1-26.

Ochsenreither S, Kuhls K, Schaar M, Presber W, Schonian G. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *J Clin Microbiol* 2006; 44(2): 495-503.

Oliveira CDL, Morais HLF, Machado-Coelho GLL. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. *Cad Saúde Pública* 2008; 24(12): 2953-8.

Orlandi PA, Turco SJ. Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Biol Chem* 1987; 262(21): 10384-91.

Peters NC, Egen JG, Secundino NF, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, *et al.* In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. *Science* 2008; 321(5891): 970-4.

Pintado VMD, Martín-Rabadán PMD, Rivera MLMD *et al.* Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected and Non-HIV-Infected Patients: A Comparative Study. *Medicine*. 2001; 80(1): 54-73.

Pimenta PFP, Turco SJ, McConville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, Sacks DL. Stage-Specific Adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midgut. *Science* 1992; 256: 1812-15.

Pimenta PFP, Saraiva EMB, Rowton E, Modi GB, Garraway LA, Beverley SM, *et al.* The vectorial competence of phlebotominae sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 9155-59.

Pimenta PFP, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly midgut. *Parasitol* 1997; 115(Pt 4): 359-69.

Proudfoot L, Nikolaev AV, Feng GJ, Wei XQ, Ferguson MAJ, Brimacombe JS *et al.* Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Immunology* 1996; 93: 10984-9.

Ready PD. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill* 2010; 15(10): 1-11.

Ritter U, Frischknecht F, van Zandbergen G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends Parasitol* 2009; 25(11): 505-10.

Rocha MN, Margonari C, Presot IM, Soares RP. Evaluation of 4 polymerase chain reaction protocols for cultured *Leishmania* spp. typing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 68: 401-9.

Rotureau B. Are New World leishmaniases becoming anthroponoses? *Med Hypotheses* 2006; 67(5):1235-41.

Sacks DL, Modi G, Rowton E, Spath G, Epstein L, Turco SJ. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(1): 406-11

Sacks DL, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 2001; (55): 453-83.

Sacks DL, Pimenta PFP, McConville MJ, Schneider P, Turco SJ. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* 1995; 181: 685-97.

Secundino N, Kimblin N, Peters NC, Lawyer P, Capul AA, Beverley SM, *et al.* Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies. *Cel Microbiol* 2010; 12(7): 906-18.

Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 1965; 52(3-4): 591-611.

Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother* 2004;10: 307-15.

Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006; 123: 311-30.

Soares RPP, Macedo ME, Ropert C, Gontijo NF, Almeida IC, Gazzinelli RT, *et al.* *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Mol Biochem Parasitol* 2002; 121: 213-24.

Soares RPP, Turco SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An Braz Acad Scienc* 2003; 75(3): 301-30.

Soares RPP, Barron T, McCoy-Simandle K, Svobodova M, Warburg A, Turco SJ. *Leishmania tropica*: intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by different *Phlebotomus* species. *Exp Parasitol* 2004; 107: 105-14.

Soares RPP, Cardoso TL, Barron T, Araújo MSS, Pimenta PFP, Turco SJ. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *Int J Parasitol* 2005; 35: 245-53.

Soares RP, Margonari C, Secundino NC, Macedo ME, da Costa SM, Rangel EF, *et al.* Differential midgut attachment of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the sand flies *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* and *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 1-7.

Sudia WD, Chamberlain RW. Battery-operated light trap, an improved model. *Mosq News* 1962; 22(37): 126-9.

Sutterwala FS, Noel GJ, Clynes R, Mosser DM. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J Exp Med* 1997; 185(11): 1977-85.

Tuon FF, Amato VS, Bacha HA, AlMusawi T, Duarte MI, Netos VA. Toll-like receptors and Leishmaniasis. *Infec Immun* 2008; 76(3): 866-72.

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

Turco SJ. Trypanosomatid surface and secreted carbohydrates. In: Marr JJ, Nilsen TW, Komuniecki RW, editores. *Molecular Medical Parasitology. Section II: Biochemistry and cell biology protozoa. Chapter 10 - Trypanosomatid surface and secreted carbohydrates.* [s.l.]: Academic Press; 2003. P.225-40. ISBN 10: 978-0-12-473346-6. ISBN 13: 978-0-12-473346-6.

Zemanová E, Jirku M, Maurício IL, Miles MA, Lukes J. Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 70(6): 613-7.