

AMANDA AMBROSIO MOREIRA

O PAPEL DA ELASTASE NEUTROFÍLICA EM
INFECÇÕES EXPERIMENTAIS POR *Leishmania infantum*
chagasi



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

RIO DE JANEIRO

DEZEMBRO / 2016

Trabalho realizado no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, sob a orientação da Professora Ana Paula Cabral de Araujo Lima e coorientação de Bruna Torres Dias.

CIP - Catalogação na Publicação

Moreira, Amanda Ambrosio

M835p O papel da elastase neutrofílica em infecções experimentais por *Leishmania infantum chagasi* / Amanda Ambrosio Moreira. -- Rio de Janeiro, 2016.

62 f.

Orientadora: Ana Paula Cabral de Araújo Lima.
Coorientadora: Bruna Torres Dias.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2016.

1. Leishmania. 2. Leishmaniose visceral. 3. Infecção. 4. Macrófagos. I. Lima, Ana Paula Cabral de Araújo, orient. II. Dias, Bruna Torres, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

AMANDA AMBROSIO MOREIRA

O PAPEL DA ELASTASE NEUTROFÍLICA NAS INFECÇÕES EXPERIMENTAIS POR
Leishmania infantum chagasi.

Rio de Janeiro, 16 de dezembro de 2016.

(Ana Maria Mazotto de Almeida, PhD, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

(Christianne Bandeira de Melo, PhD, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

(Norton Heise, PhD, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

(Elvira Maria Saraiva Chequer Bou Habib, sua titulação e instituição a que pertence)

Dedico este trabalho a Deus por ter me sustentado até aqui e honrado meus esforços. Aos meus pais, Djalma e Romilda, por todo apoio e incentivo durante meu caminhar. Obrigada pelos valores passados e por me ensinarem a importância da educação. Dedico também a todos os professores que juntos contribuíram para o conhecimento construído ao longo da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível. Obrigada Senhor por me manter forte nos meus objetivos, pela saúde e por me cercar de pessoas incríveis que me apoiam na busca pelos meus sonhos.

À minha família, principalmente meus pais, Romilda e Djalma, e minha irmã Jéssica, por todo seu amor e apoio ao longo não só destes quatro anos de graduação, mas sim de toda a vida. Sem vocês eu não seria quem sou hoje, tanto como pessoa quanto profissional.

À minha orientadora, professora Ana Paula, pela oportunidade dada, por todos os ensinamentos, puxões de orelha, apoio e por ser inspiração para tantas pessoas.

À Tatiana Costa por ter me ajudado a dar os primeiros passos, pela paciência, pelas risadas e pelos conselhos valiosos ao longo da minha trajetória no laboratório.

Agradeço especialmente a minha coorientadora Bruna Torres por todos os ensinamentos passados, pelo carinho e apoio, por me ajudar nos momentos de dificuldade. Você teve um papel fundamental no meu amadurecimento como profissional e me tornar quem eu sou hoje!

A todo o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Proteases pelo apoio e união nesses anos, por toda contribuição de conhecimento e de momentos felizes, pela amizade.

Ao CNPq por todo suporte financeiro dado ao meu trabalho.

Agradeço de todo meu coração às minhas divas Caroline Esther, Caroline Monteiro, Celina Guedes, Gabriela Cardoso, Lethielle Ribeiro e Luana Mafra por esses quatro anos de alegria, pelos momentos inesquecíveis e pelo ombro amigo nas horas tristes. Vocês são o maior presente que a UFRJ me deu!

E por fim, à Bruna Nunes e Larissa Petra pelos nove anos de amizade, por sempre acreditarem em mim e por todo apoio dado, amo muito vocês. E aos meus amigos André Luiz, Carol Martins e Ingrid Costa por estarem sempre comigo e por me acalmarem nos momentos de desespero. Obrigada por tudo!

Ou escreves algo que valha a pena ler, ou fazes algo acerca do qual valha a pena escrever.

– *Benjamin Franklin.*

RESUMO

AMANDA AMBROSIO MOREIRA

O PAPEL DA ELASTASE NEUTROFÍLICA NAS INFECÇÕES EXPERIMENTAIS POR *Leishmania infantum chagasi*

Orientadora: Ana Paula Cabral de Araujo Lima

As leishmanioses são ocasionadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas pelo flebotomíneo infectado. A leishmaniose apresenta sintomatologia variada, desde lesões cutâneas até a leishmaniose visceral, forma mais grave da doença. O desenvolvimento dos sintomas e a progressão das patologias distintas dependem da espécie de *Leishmania*, da constituição genética e do estado de saúde do hospedeiro, bem como da resposta imune. A análise dos genomas de diferentes espécies de *Leishmania* demonstrou que apenas alguns genes são espécie-específicos, sugerindo que a regulação da expressão gênica no parasito também seja fundamental para a patogênese da doença. Em *L. major*, espécie causadora da leishmaniose cutânea, foram descritos três genes semelhantes à ecotina, um inibidor de serino proteases da família S1A encontrado em bactérias, e denominados *ISP1*, *ISP2*, *ISP3*. Demonstramos que o *ISP2* da *L. major* inibe a atividade da elastase neutrofílica (NE) durante a fagocitose do parasito por macrófagos. *L. major* transgênicas deficientes em *ISP2* apresentam sobrevivência reduzida em macrófagos, devido à ativação de uma via celular envolvendo NE - receptor do tipo Toll 2 (TLR2) e do tipo Toll 4 (TLR4). Contudo, a expressão do *ISP2* não foi detectada em *L. donovani*, causadora da leishmaniose visceral. Em ensaios de infecção *in vitro* e *in vivo* o crescimento da *L. donovani* foi reduzido tanto na presença de um inibidor sintético da NE (NEi), como na infecção de camundongos deficientes em elastase (*ela2^{-/-}*). Estes resultados indicam que na infecção por *L. donovani* a atividade do *ISP2* é silenciada em benefício da infecção, por permitir que a via de sinalização celular NE-TLR4-TLR2 permaneça ativada, garantindo a sobrevivência dos parasitos no interior dos macrófagos. A fim de investigar como o balanço *ISP2*-NE se apresenta nas diferentes espécies viscerotrópicas, avaliamos infecções de macrófagos *in vitro* e *in vivo* por *L. i. chagasi*. A expressão do *ISP2* não foi detectada em *L. i. chagasi* através da técnica de *Western blotting*. Ensaios de infecção *in vitro* demonstraram resultados divergentes, ora a ausência ou inibição da NE promove o crescimento do parasito no interior dos macrófagos, ora não há efeitos significativos. Observou-se maior crescimento intracelular do parasito na presença de NEi ou em macrófagos *ela2^{-/-}* quando comparado com a infecção em macrófagos do *background* genético (C57BL/6). Ao adicionarmos NE exógena na infecção, o crescimento intracelular dos parasitos foi diminuído após 72h, tanto em macrófagos C57BL/6, como *ela2^{-/-}*. Em infecções *in vivo* observamos maior carga parasitária no baço de camundongos *ela2^{-/-}* do que em C57BL/6. Sugerimos que na infecção por *L. i. chagasi*, a modulação da atividade da NE é um fator importante para garantir a manutenção e estabelecimento da infecção, similar ao observado em *L. major*. Porém, reformulação metodológica é necessária para resultados mais conclusivos e confiáveis.

Palavras-chave: *Leishmania*, leishmaniose visceral, infecção, macrófagos.

ABSTRACT

AMANDA AMBROSIO MOREIRA

THE ROLE OF NEUTROPHIL ELASTASE IN EXPERIMENTAL INFECTIONS OF *Leishmania infantum chagasi*

Orientador: Ana Paula Cabral de Araujo Lima

Leishmaniasis are caused by protozoans from the genus *Leishmania* and transmitted by infected sandflies. Leishmaniasis shows varied symptomatology, from cutaneous lesions to visceral leishmaniasis, the most severe form of the disease. The development of the symptoms and pathology depend on the parasite species, the host genetic background and health status, as well as, on the immune response. The analysis of the genomes from different *Leishmania* species revealed that only a few genes are species-specific, suggesting that the regulation of gene expression is also essential for pathogenesis. In *L. major*, a species that causes cutaneous leishmaniasis, three genes similar to bacterial ecotins, serine proteases from S1A family, were described and designated as *ISP1*, *ISP2*, *ISP3*. We reported that *L. major* *ISP2* acts inhibiting the activity of neutrophil elastase (NE) during parasite phagocytosis by macrophages. *L. major* transgenic lines lacking *ISP2* present reduced survival in macrophages due to the triggering of a cellular pathway involving NE – Toll like receptor type 2 (TLR2) and TLR4. However, *ISP2* expression was not detected in *L. donovani*, which causes visceral leishmaniasis. Infection assays *in vitro* and *in vivo* showed reduced intracellular growth of *L. donovani* in the presence of a synthetic inhibitor of NE (NEi) or in macrophages from elastase deficient mice (*ela2*^{-/-}). These results indicate that the lack of *ISP2* activity is beneficial during infections with *L. donovani*, by allowing triggering of a cellular pathway involving NE-TLR4-TLR2, that ensures the survival of the parasites inside macrophages. In order to investigate how the *ISP2*-NE balance occurs in the different viscerotropic species, we evaluated *in vitro* and *in vivo* infections by *L. i. chagasi*. The expression of *ISP2* was not detected in late stage promastigotes of *L. i. chagasi* by *Western blotting*. *In vitro* infection assays demonstrated divergent results, sometimes the absence or inhibition of NE promoted parasite growth inside macrophages, while no significant effects were also observed. Greater intracellular parasite growth was observed in the presence of NEi or in macrophages derived from *ela2*^{-/-} mice when compared to the infection in macrophages from C57BL/6 mice. The addition of exogenous NE *in vitro* led to decreased intracellular expansion of the parasites after 72h, both in C57BL/6 and *ela2*^{-/-} macrophages. We observed a higher parasite load in the spleen of *ela2*^{-/-} mice in comparison with C57BL/6 mice. We suggest that in *L. i. chagasi*, the modulation of NE activity is an important factor to ensure the maintenance and establishment of infection, similarly to *L. major*. However, optimization of the assay conditions is necessary for more conclusive and reliable results.

Key-words: *Leishmania*, visceral leishmaniasis, infection, macrophages.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de novos casos reportados de leishmaniose visceral no mundo em 2015	19
Figura 2 - Ciclo de vida de <i>Leishmania spp</i>	22
Figura 3 - A expressão do ISP2 não foi detectada em <i>L. i. chagasi</i>	37
Figura 4 - A inibição da elastase neutrofílica conduziu a fenótipos controversos em 72h de infecção.....	39
Figura 5 - Na ausência da elastase neutrofílica pode haver um aumento no número de parasitos no interior dos macrófagos em 72h de infecção.....	41
Figura 6 - A adição da elastase neutrofílica exógena conduziu a redução significativa do número de parasitos em 72h de infecção.....	43
Figura 7 – A ausência de crescimento da <i>L. i. chagasi</i> tanto em macrófagos C57BL/6 quanto em macrófagos <i>ela2^{-/-}</i> , na presença ou ausência de NEi, em 72h de infecção	45
Figura 8 – A ausência da elastase neutrofílica conduz a um aumento significativo no número de parasitos no baço de animais <i>ela2^{-/-}</i>	47
Figura 9 - Curva de crescimento de <i>L. i. chagasi in vitro</i>	48
Figura 10 - Microscopia óptica das promastigotas de <i>L. i. chagasi</i>	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDs: Células dendríticas.

CG: Catepsina G.

CR1: Receptor do complemento tipo 1.

CR3: Receptor do complemento tipo 3, também conhecido como Mac-1 (*macrophage-1 antigen*).

C3bi: Componente do sistema complemento, resultante da clivagem de C3b.

C5b-C9: Complexo de lise de microrganismos – componentes do sistema complemento.

C5-convertase: Enzima do sistema complemento que atua clivando o componente C5 em C5a e C5b.

C3b: Componente do sistema complemento, resultante da clivagem de C3.

FcR: Receptor para porção Fc (porção invariável das imunoglobulinas).

Gp63: Glicoproteína (metaloprotease) presente na superfície de algumas espécies de *Leishmania*.

HBSS: Solução salina balanceada de Hanks.

HIV: Vírus da imunodeficiência humana.

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio.

IgG: Imunoglobulina G.

IL (IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12): Interleucinas.

IMAC: Cromatografia por Afinidade a íons Imobilizados.

INF- β : Interferon beta.

INF- γ : Interferon gama.

iNOS: Forma induzível da óxido nítrico sintase.

ISPs: Inibidores de serino proteases.

ISP1, ISP2, ISP3: Inibidores de serino proteases 1, 2 e 3.

ISP1, ISP2, ISP3: Genes para os inibidores de serino proteases 1, 2 e 3.

ISP2r - Inibidor de serino protease 2 recombinante expresso em *E. coli*.

L. donovani:ISP2: Parasitos transgênicos cujo gene *ISP2* da *L. major* foi inserido no locus ribossomal da *L. donovani*, induzindo sua expressão.

LPG: Lipofosfoglicano.

MFR: Receptor de manose-fucose.

MyD88: Fator de diferenciação mielóide 88.

NE: Elastase neutrofílica.

NEi: Inibidor sintético específico e irreversível de elastase neutrofílica.

NK: Células *Natural Killer* (exterminadoras naturais).

NO: Óxido nítrico.

CRP: “*C-reactive protein*” - Proteína C reativa.

PCR: “*Polymerase Chain Reaction*” – Reação em cadeia da polimerase.

PGE₂ - Prostaglandina E2.

PI3K: Fosfatidilinositideo-3 quinase.

PKC: “*Protein kinase C*” - Proteína quinase C.

PKDL: Leishmaniose dermal pós-kalazar.

PKR: Proteína quinase induzida por dupla fita de RNA.

PR3: Proteinase 3.

RNA: Ácido ribonucléico. RNAm – RNA mensageiro.

ROS: Espécies reativas de oxigênio.

SDS: Dodecil sulfato de sódio.

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida adicionado de dodecil sulfato de sódio.

SFB: Soro fetal bovino.

SOCS: Supressores de sinalização de citocina.

SpdS: Glutathiona espermidina sintase.

TEMED: Tetrametiletilenodiamina.

TGF- β : Fator transformador de crescimento do tipo β .

Th1: Linfócito T *helper* do tipo 1.

TLR - Receptor do tipo toll (TLR2 e 4).

TNF- α : Fator alfa de necrose tumoral.

TRIF: “TIR *domain-containing adapter inducing IFN β* ”.

UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro.

WT: *Wild Type* – Selvagens.

Δ *isp2/3*: Parasitos deficientes nos genes para os inibidores de serino protease 2 e 3.

Δ *isp1/2/3*: Parasitos mutantes nos genes ISP1, ISP2 e ISP3.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Breve Histórico.....	16
1.2	Leishmanioses	17
1.3	Leishmaniose Visceral.....	20
1.4	Ciclo Evolutivo.....	22
1.5	Interação Parasito-Hospedeiro.....	23
1.6	Tratamento.....	24
1.7	Proteases	26
1.8	Ecotina e inibidores ortólogos presentes em Tripanossomatídeos.....	27
2	JUSTIFICATIVA.....	30
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Objetivo Geral.	31
3.2	Objetivos Específicos.	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS.	31
4.1	Animais.....	31
4.2	Parasitas.....	32
4.3	<i>Western Blotting</i>	32
4.4	Infecção <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneais por <i>Leishmania i. chagasi</i> NCL.....	33
4.5	Ensaio de infecção <i>in vivo</i> por <i>Leishmania i. chagasi</i>	34
4.5.1	Infecção de camundongos.	34
4.5.2	Avaliação da Carga Parasitária do baço.	34
4.5.3	Avaliação da Carga Parasitária do fígado	34
4.6	Análise estatística	35
4.7	Curva de crescimento de <i>L. i. chagasi in vitro</i>	35

4.8 Análise morfológica de <i>L. i. chagasi</i> por microscopia óptica	35
5 RESULTADOS	36
5.1 A expressão do ISP2 não foi detectada em <i>L. i. chagasi</i> através da técnica de <i>Western blotting</i>	36
5.2 A inibição da elastase neutrofílica promoveu fenótipos divergentes na infecção pela <i>Leishmania i. chagasi</i> em 72h de infecção.....	38
5.3 Na ausência da elastase neutrofílica há um aumento do número de parasitos em 72h de infecção?.....	40
5.4 A adição da elastase neutrofílica exógena ao ensaio reduziu significativamente o número de parasitos no interior de macrófagos C57BL/6 e <i>ela2^{-/-}</i> em 72h de infecção.....	42
5.5 Cinética da infecção de macrófagos murinos por <i>L. i. chagasi</i>	44
5.6 Na ausência da elastase neutrofílica há maior carga parasitária no baço de animais <i>ela2^{-/-}</i>	46
5.7 <i>L. i. chagasi</i> promastigota não atingiu fase estacionária de crescimento nas culturas <i>in vitro</i>	48
5.8 Análise morfológica da <i>L. i. chagasi</i> por microscopia óptica	49
6 DISCUSSÃO.....	50
7 CONCLUSÃO	56
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Breve Histórico

Apesar da primeira descrição clínica de Leishmaniose cutânea ter ocorrido em 1756 por Alexander Russell ao analisar lesões em pacientes turcos, achados arqueológicos sugerem a existência da doença desde o primeiro século depois de Cristo (Bari, 2006). A leishmaniose tegumentar americana foi retratada através de pinturas, múmias humanas e cerâmicas, demonstrando sua ocorrência em civilizações pré-incas, por ceramistas incas no Peru e Equador e pelos colonizadores espanhóis. A doença foi mencionada pela primeira vez no Brasil em 1827 no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica, citada no livro de Julio Cesar Tello intitulado “*Antiguidad de la Syphilis em El Peru*” (Rey, 2008; Cardoso *et al.*, 2014).

Acredita-se que a leishmaniose visceral, também conhecida como Kalazar, que significa “Febre Negra” em Hindu, acomete populações anteriormente aos seus registros, principalmente devido ao fato de ter sido confundida com malária, doença comum na época. A doença foi citada pela primeira vez em 1885 por Cunningham na Índia (<http://www.bus.org.in/>). Em 1896, Rogers a denominou como uma forma maligna da malária. Todavia, em 1903, Manson se opôs a esta teoria após notar a ausência de periodicidade nos quadros febris, que são característicos de malária, e da susceptibilidade ao quinino, sugerindo que o agente etiológico da doença poderia ser um tripanossomatídeo. No mesmo ano, o inglês William Boog Leishman relatou ao *British Medical Journal* a observação de corpúsculos nos baços de soldados na Índia, sugerindo a possibilidade de ocorrência da tripanossomíase no país. Charles Donovan reportou que ao analisar baços de pacientes que sofriam da febre e apresentavam esplenomegalia em Madras, encontrou corpos similares aos relatados anteriormente por Leishman. Donovan concluiu que o causador da doença não era *Trypanosoma* e publicou seus achados no jornal britânico como um memorando a Leishman (<http://www.bus.org.in/>). Ronald Ross denominou o gênero de *Leishmania* em homenagem a Leishman pela descoberta do parasito e Laveran deu o nome de *Leishmania donovani* ao agente Causador da Kalazar (<http://www.bus.org.in/>). Wright isolou o parasito da lesão cutânea de uma criança armênia e o denominou de *Leishmania tropica*. Em 1909, Lindenberg, Carini & Paranhos, independentemente, identificaram a presença de um parasito similar ao isolado por Wright em lesões de pacientes brasileiros, sendo

denominado posteriormente como *Leishmania braziliensis* por Gaspar Vianna, pois acreditava que não se tratava da mesma espécie isolada por Wright (Rey, 2008; Cardoso *et al.*, 2014). Atualmente são descritas mais de 20 espécies relacionadas com a doença (Hide *et al.*, 2007).

1.2 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* e sua transmissão ocorre através de um inseto vetor, dípteros pertencentes à família *Psychodida*, comumente associada ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. Apenas 31 dentre as 500 espécies conhecidas de flebotomíneos foram identificadas como vetores das espécies patogênicas de *Leishmania* (Altamirano-Enciso *et al.*, 2003; Hide *et al.*, 2007).

O parasito pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e apresenta duas formas evolutivas. A amastigota é a forma replicativa encontrada no hospedeiro vertebrado. Esta forma é caracterizada por um citoplasma ligeiramente achatado e de contorno ovoide, que pode variar em elíptico ou fusiforme e apresenta um flagelo rudimentar intracelular. O cinetoplasto apresenta um aspecto baciliforme, reto ou curvo e situa-se geralmente tangente ao núcleo redondo e excêntrico. Ao serem ingeridas pelo hospedeiro invertebrado, o parasito se diferencia na forma promastigota, assumindo um formato fusiforme ou piriforme. Na região anterior arredondada, emerge um comprido flagelo responsável pela locomoção. O núcleo é maior que na forma amastigota e situa-se no terço médio da célula; o cinetoplasto apresenta conformação de pequeno bastonete curvo, dispondo-se anterior ao núcleo (Rey, 2008).

Diferentes espécies de *Leishmania* causam um amplo espectro de doenças e o desenvolvimento dos sintomas clínicos depende de uma combinação complexa de fatores do parasito e do hospedeiro. A doença se classifica, portanto, em leishmaniose tegumentar, que pode apresentar-se sob a forma cutânea, cutânea difusa ou mucocutânea, e visceral. A leishmaniose cutânea é caracterizada pelo surgimento de lesões no local da picada no inseto e ao entorno. Alguns indivíduos podem ser assintomáticos e outros desenvolverem as lesões, que geralmente manifestam-se como pápulas ou nódulos e tornam-se úlceras de bordas bem elevadas. Entretanto, essas lesões podem se autocurar sem a necessidade de terapia específica

(Center for Disease Control, 2013). A leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença, representando de 50-75% dos novos casos e é causada principalmente pela *L. major* e espécies do complexo *L. mexicana*. A leishmaniose mucocutânea está principalmente associada à espécie *L. braziliensis* e caracteriza-se pelo surgimento de lesões em áreas de mucosa do indivíduo, acometendo boca e nariz, levando a destruição tecidual e causando um quadro desfigurativo (Hide *et al.*, 2007). A forma mais grave da doença é denominada leishmaniose visceral e representa 100% de letalidade se não tratada (<http://www.who.int/leishmaniasis>). As espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum chagasi* pertencem ao complexo *Leishmania donovani* e são responsáveis pelo quadro que acomete baço, fígado e medula óssea. O surgimento dos sintomas varia de meses a anos e se caracterizam por febres irregulares, perda de peso substancial, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e trombocitopenia (Hide *et al.*, 2007; CDC, 2013). Indivíduos aparentemente curados da leishmaniose visceral podem apresentar um quadro de lesões cutâneas difusas que comumente acometem a face, braços e abdômen. O surgimento dessas lesões foi denominado de Leishmaniose Dermal pós-kalazar (PKDL) e ocorre geralmente a partir de 6 meses após a cura da doença visceral, podendo demorar anos. A PKDL é comum no oeste africano e no subcontinente indiano, onde podem atingir até 50% dos casos (<http://www.who.int/leishmaniasis>).

Os casos de leishmaniose cutânea ocorrem majoritariamente no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria. Os países Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão compreendem mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral no mundo (Fig. 1), contudo, Bangladesh tem apresentado uma redução deste número devido ao progresso na eliminação da doença no Sudeste da Ásia (WHO, 2015).

Na América Latina, a leishmaniose cutânea e mucocutânea são endêmicas em 18 países, tendo sido registrado 743.970 casos com uma média anual de 57.228 no período de 2001 a 2013. Em 2013, 78,8% dos registros encontraram-se no Brasil e em países da sub-região Andina. A leishmaniose visceral está presente em 12 países das Américas, somando um total de 45.490 casos com média anual de 3.499 no período de 2001 a 2013, ocorrendo um registro total de 3.389 casos em oito países no ano de 2013, estando sua maioria concentrado no Brasil (96%). Trinta e sete por cento destes casos correspondem a crianças menores de 5 anos (PAHO/WHO, 2013).

A leishmaniose visceral acarreta um quadro de imunossupressão devido o acometimento da medula óssea, sendo mais preocupantes os casos de coinfeção em indivíduos imunossuprimidos. O primeiro caso reportado de coinfeção do parasito com Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) aconteceu em 1985 no sudeste da Europa e cinco anos depois, pela primeira vez nas Américas (De La Roma *et al.*, 1985 *apud* Lindoso *et al.*, 2014; Nicodemo *et al.*, 1990 *apud* Lindoso *et al.*, 2014). A urbanização da leishmaniose e a propagação do HIV para áreas rurais levou a um aumento exponencial dos casos de leishmaniose como doença oportunista e à imunossupressão cumulativa nestes pacientes, diminuindo suas expectativas de vida (Barreto-De-Souza *et al.*, 2006; Lindoso *et al.*, 2014). Estudos demonstraram que a infecção por *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani* estimula a multiplicação viral através do aumento da transcrição do genoma do HIV (Bernier *et al.*, 1995; Garg *et al.*, 2009; Zhao, Papadopoulou e Tremblay, 2016). O oposto também ocorre, Barreto-de-Souza e colaboradores, em 2006, demonstraram que a proteína Tat do HIV-1 inibe a atividade leishmanicida do Interferon-gama (INF- γ) e estimula a produção de Prostaglandina E2 (PGE₂), culminando na secreção de Fator Transformador de Crescimento do tipo β 1 (TGF- β 1) e consequentemente, no aumento do crescimento da *Leishmania* em macrófagos humanos. Na Europa, a prevalência da coinfeção é observada majoritariamente em usuários de drogas injetáveis, rota mais comum de infecção pelo vírus no continente, ao contrário do observado nas Américas, onde a principal via de transmissão é a sexual (Lindoso *et al.*, 2014).

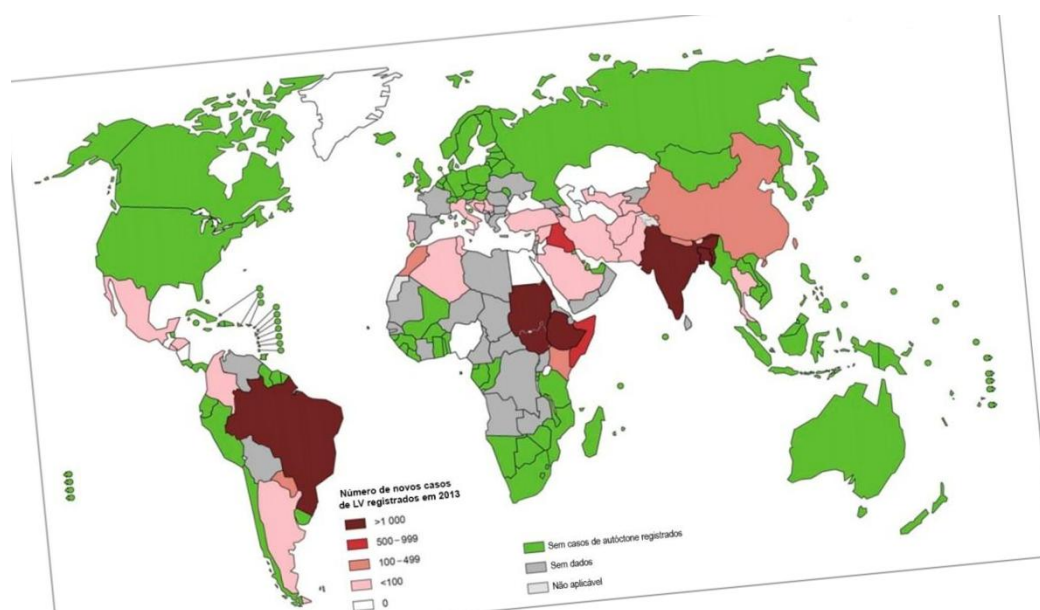


Figura 1 - Número de novos casos reportados de leishmaniose visceral no mundo em 2015. **Fonte:** WHO, Organização Mundial da Saúde – Control of Neglected Tropical Diseases, 2015.

1.3 Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose visceral é causada por espécies pertencentes ao gênero e subgênero *Leishmania* e diversos estudos foram realizados a fim de entender sua filogenia e aparecimento no Novo Mundo (Mauricio *et al.*, 1999; Kuhls *et al.*, 2011). O sequenciamento dos genomas das espécies viscerotrópicas, revelou a impossibilidade de distinguir geneticamente as espécies *Leishmania infantum* (circulante no Velho Mundo) de *Leishmania chagasi* (circulante nas Américas), levando à unificação das duas espécies na espécie única *Leishmania infantum chagasi* para definir a espécie responsável pelas ocorrências da doença nas Américas, evidenciando a introdução do parasito no continente através da colonização europeia (Mauricio, Stothard e Miles, 2000; Kuhls *et al.*, 2011).

Diversas hipóteses têm sido levantadas visando entender o processo que leva o parasito do local da picada até os órgãos viscerais, como por exemplo, a migração de macrófagos e células dendríticas infectadas, a resposta imune gerada pelo hospedeiro, genes específicos que levem à visceralização e à maior tolerância a temperaturas altas pelos parasitos viscerotrópicos. A temperatura decorrente da febre em leishmaniose visceral excede 40°C (Wittner e Tanowitz, 2000), enquanto que na leishmaniose cutânea o parasito vive em ambientes onde a temperatura varia entre 28-32°C na derme da pata de camundongos infectados (Scott, 1985). Como a febre é capaz de amplificar a resposta imune, conduzindo a um aumento na migração de células fagocíticas, impactando a produção de citocinas pró-inflamatórias e a eliminação do parasito por moléculas oxidantes, como óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio por fagócitos (H₂O₂), também espera-se que as espécies viscerotrópicas sejam mais resistentes à defesa mediada por oxidantes (Revisto por Mccall, Zhang e Matlashewski, 2013). De fato, a *L. donovani* parece mais resistente à ação de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio que a *L. major* (Sarkar *et al.*, 2012).

Entender quais fatores genéticos influenciam o tropismo da *Leishmania* e a forma da doença tem sido alvo dos pesquisadores. Apesar da grande diferença entre os quadros clínicos da doença, poucos genes são específicos entre as espécies de *Leishmania*. Peacock e colaboradores identificaram 5 genes espécie-específicos em *L. major*, 26 em *L. infantum* e aproximadamente 47 em *L. braziliensis*. O gene codificante para fosfatidilinositol ou fosfatidilcolina de transferência está presente em *L. infantum*, porém se encontra como pseudogene em *L. braziliensis* e está ausente em *L. major*. Apesar de função ainda

desconhecida, acredita-se que possa influenciar nas moléculas de superfície do parasito e atuar em sinergismo com a proteína fosfatidilinositideo-3 quinase (PI3K), também presente em *L. infantum* e encontrada como pseudogene em outras espécies de *Leishmania*, em processos que afetam o tropismo do parasito por órgãos viscerais. Outro gene encontrado como específico de *L. infantum* codifica a Glutathione S-transferase (SpdS), enzima importante na proteção do parasito contra o estresse oxidativo (Peacock *et al.*, 2007).

Infecções experimentais com *L. donovani* em camundongos demonstraram que o fígado é o sítio de uma infecção aguda com mínimo dano tecidual e resistente à reinfeção enquanto o baço e a medula óssea desenvolvem uma infecção crônica progressiva e assintomática. As células de Kupffer infectadas produzem quimiocinas que recrutam monócitos, neutrófilos e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ para o fígado, levando à formação de granulomas inflamatórios que são importantes para o controle do crescimento do parasito no órgão. Contrariamente, a persistência da *Leishmania* no baço leva à esplenomegalia, falha na formação de granulomas e na perturbação da estrutura do tecido linfoide (Revisto por Stanley e Engwerda, 2007). Como a leishmaniose visceral experimental em camundongos requer a inoculação dos parasitos diretamente na corrente sanguínea e a infecção no fígado é controlada, ela difere do quadro observado em humanos, tornando o modelo limitado. No entanto, as espécies viscerotrópicas inoculadas experimentalmente em camundongos estabelecem infecções nas vísceras, o que não é observado com espécies cutâneas, validando o modelo de leishmaniose visceral experimental para o estudo de fatores que contribuem para a persistência do parasito. Essas observações também revelam que independentemente dos fatores que controlam a saída das espécies viscerotrópicas do sítio de inoculação na derme para as vísceras, estas são intrinsecamente melhor adaptadas para a sobrevivência e proliferação nos órgãos internos do que as espécies tegumentares.

1.4 Ciclo Evolutivo

Para maturação de seus ovos, a fêmea hematófaga do flebotomíneo pica um hospedeiro vertebrado. Durante o repasto sanguíneo, as formas infectivas promastigotas metacíclicas são inoculadas e rapidamente fagocitadas por células do sistema imune, tais como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. A passagem do parasito em neutrófilos parece ser transitória, funcionando como refúgio, porém em macrófagos a infecção se estabelece, funcionando como sítio definitivo de replicação. No interior do macrófago, o parasito se diferencia para a forma amastigota e se multiplica através de fissões binárias em fagolisossomos, promovendo a lise da célula e liberação dos parasitos. As formas amastigotas são capazes de infectar novas células ou um novo vetor após o repasto sanguíneo. No trato digestivo do flebotomíneo, o parasito se diferenciará na forma promastigota procíclica e dará início a nova fase de multiplicações sucessivas. As promastigotas passam pelo processo de metaciclo (diferenciação para as formas metacíclicas) e tornam-se novamente infectivas ao hospedeiro vertebrado. O ciclo se reinicia após inoculação em novo hospedeiro (Revisto por Kevric, Cappel e Keeling, 2015). O esquema do ciclo está ilustrado na figura 2, evidenciada abaixo.

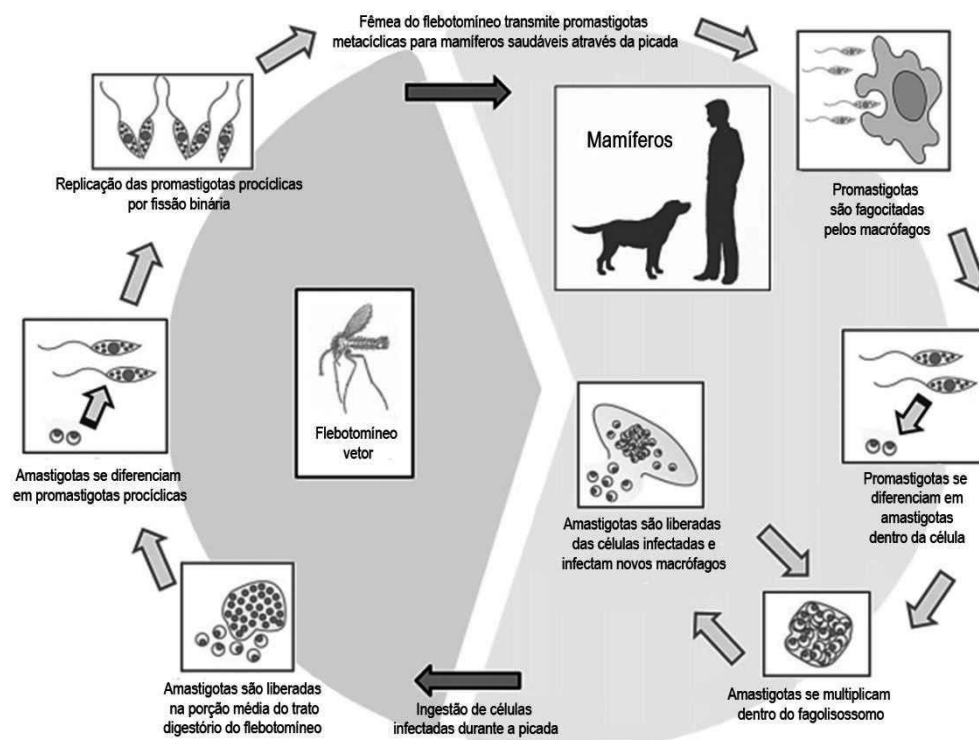


Figura 2 - Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Retirado e traduzido de CARDOSO *et al.*, 2014. Leishmaniasis: History, Evolution, of Treatment and the Need for New Drugs. Current Biotechnology.

1.5 Interação Parasito-Hospedeiro

A interação parasito-hospedeiro é dependente de moléculas de superfície do parasito, ou secretadas, e de receptores encontrados na superfície da célula hospedeira. A forma promastigota metacíclica da *Leishmania* é responsável pela transmissão e resistência no homem, apresentando mecanismos de sobrevivência ao sistema imune. Algumas moléculas de superfície foram bem caracterizadas. Como exemplo, lipofosfoglicano (LPG) é a molécula de superfície mais abundante nas formas promastigotas e sua estrutura varia entre as espécies de *Leishmanias*. Diversos papéis foram atribuídos ao LPG no sucesso da infecção pela *Leishmania*, como a capacidade de impedir a lise do parasito mediada por ação do sistema complemento ao prevenir a ligação das subunidades de C5b-C9 (Puentes *et al.*, 1989); a inibição da Proteína Quinase C (PKC), quinase relacionada com a resposta oxidativa dos macrófagos (Giorgione, Turco e Epanand, 1996), resultando assim, na modulação da biogênese do fagolisossomo durante os estágios iniciais da infecção em macrófagos, através do retardo da fusão do vacúolo parasitóforo com organelas da via endocítica (Chan *et al.*, 1989); atuação em sinergismo com INF- γ , contribuindo para ativação de macrófagos, resultando na regulação positiva da expressão da óxido nítrico sintase (Proudfoot *et al.*, 1996).

A glicoproteína 63 (gp63) é uma metaloprotease presente na superfície da *Leishmania* e, inicialmente, atribuiu-se a ela a função de obtenção de nutrientes para o crescimento do parasito. Além disso, também está relacionada à proteção do parasito contra lise celular por meio da conversão C3b em sua forma inativa C3bi, evitando assim, a formação da convertase C5 e posterior morte do parasito (Brittingham *et al.*, 1999). A caracterização de linhagens transgênicas de *L. major* deficientes em gp63 revelou que esta protease cliva diversas proteínas da célula hospedeira, incluindo fatores de transcrição (Contreras *et al.*, 2010) e fosfatases (Gomez *et al.*, 2009), sendo considerada um fator de virulência crucial. Além disso, foi descrito que a gp63 modula a distribuição do conteúdo de exosomas no parasito, que por sua vez secretados, exercem papel modulatório na inflamação inata e no recrutamento de leucócitos (Hassani *et al.*, 2014). Diversos estudos demonstraram a participação de receptores de macrófagos na entrada do parasito, como Receptores do Sistema Complemento tipo 1 e tipo 3 (CR1 e CR3), receptor para fibronectina, Receptor de Manose-Fucose (MFR) (apenas nas formas promastigotas) e Receptor para porção Fc (FcR) (Mosser e Edelson, 1985; Guy e Belosevic, 1993). Demonstrou-se também que a opsonização de amastigotas de *L. major* por

Imunoglobulina G (IgG) específica conduz ao aumento da entrada do parasito em macrófagos através da ligação ao FcR (Guy e Belosevic, 1993).

Após a fagocitose das formas promastigotas, células dendríticas (CDs) e macrófagos são ativados e induzidos a liberarem Interleucina-12 (IL12), havendo a ativação de células *Natural Killer* (NK) e a diferenciação e proliferação de linfócitos T CD4⁺ em população de linfócito T-helper do tipo 1 (Th1). Ao serem ativadas, essas células produzem grande quantidade de Interferon- γ (INF- γ) que é grande ativador de macrófagos e possui papel na indução da produção de Fator alfa de Necrose Tumoral (TNF- α) pela célula fagocítica. O sinergismo entre INF- γ e TNF- α leva ao aumento da fagocitose e da atividade leishmanicida do macrófago (Cunningham, 2002).

Durante sua evolução, as espécies de *Leishmania* desenvolveram diversos mecanismos de subverter a resposta imune do hospedeiro para o sucesso da sua infecção. No interior dos macrófagos, o parasito é capaz de modular vias de sinalização celular, inibindo respostas mediadas por citocinas através da interferência na fosforilação de proteínas que são essenciais pra resposta da célula. Bertholet *et al.*, 2003, investigaram a expressão de genes Supressores de Sinalização de Citocinas (SOCS) em macrófagos humanos infectados por *L. donovani* e relataram a indução do aumento de RNA mensageiro (RNAm) para SOCS3 pelo parasito. Essa indução também foi observada em *L. major* e *L. amazonensis*, porém em níveis menores.

1.6 Tratamento

O primeiro tratamento para leishmaniose foi desenvolvido em 1912 pelo médico Gaspar Vianna através da administração intravenosa do tártaro emético. Apesar de seu mecanismo de ação não ser bem compreendido, foi utilizado como o único tratamento para doença por muitos anos. Devido a sua forma de administração e grande toxicidade, que gerava danos principalmente ao coração e ao sistema gastrointestinal, o tártaro emético foi substituído pelos antimoniais pentavalentes, que vieram a se tornar as principais drogas utilizadas no tratamento da leishmaniose até os dias atuais (Cardoso *et al.*, 2014). O Antimoniato de N-metilglucamina, comercializado sob o nome de Glucantime®, e o Gluconato de antimônio sódico (Pentostam®) passaram a ser amplamente utilizados a partir de 1940. O mecanismo de ação não é completamente entendido, porém, acredita-se que esses

antimoniais atuam como pró-fármaco e inibam seletivamente enzimas do metabolismo nas formas amastigotas de *Leishmania spp.* (Rath *et al.*, 2003; Monzote, 2009; Cardoso *et al.*, 2014). Apesar de se mostrarem eficientes, são responsáveis por complicações cardíacas, renais e pancreáticas (Rajr *et al.*, 1994; Zaghloul *et al.*, 2004; Matoussi *et al.*, 2007). Além disto, parasitos têm adquirido resistência à droga e indivíduos imunossuprimidos não respondem bem ao tratamento, comprometendo assim, sua eficácia (Berman, 1988).

Pentamidina (Pentam® e Lomidine®) e Anfotericina B (AmBisome®) são drogas de segunda geração e utilizadas em casos de parasitos resistentes ou de pacientes que não responderam à terapia convencional com antimoniais pentavalentes. A Pentamidina tem seu uso limitado na clínica devido sua cardio e nefrotoxicidade e estudos já demonstraram que sua efetividade é inferior à Glucantime® (Ouellette *et al.*, 1998; Luna *et al.*, 2005 *apud* Cardoso *et al.*, 2014). Anfotericina B é amplamente utilizada na terapia de infecções fúngicas sistêmicas devido a sua capacidade de se ligar a esteróis de membrana dos fungos. A droga também se mostrou eficaz no tratamento da leishmaniose, uma vez que ao se ligar ao ergosterol presente na membrana celular do parasito, desestabiliza a membrana da célula provocando a perda de cátions, sobretudo K^+ , levando à morte da *Leishmania*. Apesar de efetivo, seu uso na clínica também é limitado devido a sua baixa toxicidade seletiva, atingindo não só a *Leishmania*, como também, o colesterol das células de mamíferos (Berman *et al.*, 1998; Ordóñez-Gutiérrez *et al.*, 2007)

O primeiro medicamento oral efetivo aprovado para comércio foi a Miltefosina (Impavido® ou Miltex®) em 2002. A Miltefosina é um análogo alquilfosfolipídico e inicialmente utilizado como antitumoral; possui a capacidade de alterar o metabolismo lipídico (Croft *et al.*, 1987), inibindo fosfolipídios de membrana e a síntese de ergosterol por tripanosomatídeos, levando à apoptose do parasito (Paris *et al.*, 2004). Também foi mostrado que a droga atua estimulando a produção de Óxido Nítrico Sintase 2 (iNOS2) pela célula hospedeira, catalisando a geração de NO dentro do macrófago (Wadhone *et al.*, 2009), culminando também na eliminação da *Leishmania*. Devido a sua facilidade de administração, tem sido utilizada como droga de primeira linha no tratamento da leishmaniose em países como Índia, Nepal e Bangladesh. Sua eficácia tem se mostrado variável em relação às espécies de *Leishmania* e as formas cutânea e visceral (Soto *et al.*, 2004; Sundar *et al.*, 2012). Por ter pouco tempo de comercialização, ainda não se sabe muito a respeito dos efeitos adversos, porém, estudos demonstraram sintomas como distúrbios gastrointestinais, dores de

cabeça, aumento das enzimas do fígado. Foi demonstrado grande poder teratogênico associado à droga, sendo de extrema importância que mulheres em idade reprodutiva façam uso de contraceptivo durante o tratamento e até 3 meses após seu fim. (Sundar *et al.*, 2012; Cardoso *et al.*, 2014).

1.7 Proteases

As proteases, conhecidas também como peptidases, são enzimas que atuam como catalisadores biológicos, acelerando a clivagem de ligações peptídicas. Constituem 2% do genoma expresso, com pouca variabilidade entre os organismos e possuem papel de extrema importância, pois estima-se que na sua ausência as reações de hidrólise destas ligações levariam centenas de anos (Sajid e Mckerrow, 2002). Dividem-se em endoproteases, onde a clivagem ocorre dentro da cadeia polipeptídica, e exoproteases, na qual a clivagem é realizada em até três resíduos de aminoácidos das extremidades amino-terminal (aminoproteases) ou carboxi-terminal (carboxiproteases). São agrupadas com base em sua ação catalítica durante o processo hidrolítico, sendo descritos seis grupos: (i) Serino Proteases, possuem uma serina no sítio ativo enzimático (ii) Cisteíno proteases, caracterizadas por um resíduo de cisteína no sítio ativo (iii) Proteases de Ácido Aspártico, utilizam dois resíduos de ácido aspártico em seu sítio (iv) Metallo proteases, dependentes de um metal no sítio ativo, comumente associado ao zinco (v) Treonina Proteases que possui uma Treonina N-terminal no sítio ativo e (vi) Proteases de Ácido Glutâmico, díade catalítica constituída por resíduos de ácidos Glutâmico e Glutamina (Barrett, 1994; Seemüller *et al.*, 1995; Sajid e Mckerrow, 2002; Rawlings *et al.*, 2014). Classificam-se pela homologia de suas sequências ou estruturas. Os clãs são agrupados pela existência de um ancestral comum e são subdivididos em famílias, de acordo com a homologia entre as estruturas conformacionais das enzimas (Rawlings *et al.*, 2014).

As serino proteases constituem quase um terço de todas as proteases e são encontradas em todos os organismos. Abrangem tanto exoproteases quanto endoproteases e sua tríade catalítica constitui-se de uma histidina, atuando como base, um ácido aspártico, como grupo eletrofílico e de um resíduo de serina, grupo nucleofílico e principal (Rawlings e Barrett, 1994). Foram descritos 13 clãs de Serino Proteases, sendo os principais o clã B (SB), o clã C (SC), o clã E (SE) e o clã F (SF) que agrupam famílias que possuem um ancestral comum

com a subtilisina, com a carboxipeptidase C, com a peptidase A d-ala-d-ala de *E. coli* e com o repressor do LexA, respectivamente (Rawlings *et al.*, 2014).

A família S1A é a principal representante do grupo das serino proteases e abrange enzimas tais como tripsina, quimiotripsina, calicreína plasmática, fator Xa e XIIa. Dentro desta família, tem-se também a elastase neutrofílica (NE), catepsina G (CG) e proteinase 3 (PR3), enzimas presentes nos grânulos azurofílicos de neutrófilos; estas atuam modificando proteoliticamente a atividade de diversas quimiocinas e convertem precursores inativos em formas ativas (Revisto por Pham, 2010). A NE induz a propagação da inflamação e migração de leucócitos ao estimular a secreção de citocinas IL-6 e IL-8 por células epiteliais, ao mesmo tempo em que degrada IL-1 β , IL-1, IL-2 (Bedard *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1992; Ariel *et al.*, 1998). Camundongos deficientes em NE apresentaram uma redução significativa dos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e um defeito na adesão e transmigração leucocitária induzida por Zimosan (Young *et al.*, 2004). Além disso, estudos demonstraram que NE cliva fatores de virulência das enterobactérias *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* e *Yersinia enterocolitica* e, juntamente com a catepsina G, possui atividade fungicida contra *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* (Revisto por Pham, 2010).

1.8 Ecotina e inibidores ortólogos presentes em Tripanossomatídeos

A Ecotina é uma proteína dimérica de 18kDa presente no periplasma *Escherichia coli*, termoestável e capaz de se manter ativa em pH ácido, o que favorece a colonização do intestino pela bactéria. Atua inibindo potencialmente serino proteases da família S1A e pertencentes ao clã PA do hospedeiro, funcionando como fator de virulência da bactéria (Chung *et al.*, 1983). Foi demonstrado que cepas de *E. coli* deficientes na produção de ecotina são mais suscetíveis à morte devido a maior permeabilidade da membrana externa, esta causada pela clivagem da proteína OmpA pela NE (Eggers *et al.*, 2004). Além disso, a ecotina possui atividade contra proteases pancreáticas e de defesa do hospedeiro, como a tripsina, quimase de mastócitos, quimiotripsina, catepsina G. É também ativa contra fatores da coagulação, como calicreína plasmática, fator Xa e XIIa e uroquinase plasmática humana, porém menos eficientemente (Chung *et al.*, 1983; Eggers *et al.*, 2004). Proteínas ortólogas à ecotina também são encontradas em outras espécies bacterianas como *Pseudomonas*

aeruginosa, *Shigella spp.*, *Yersinia pestis* e *Salmonella*, bem como em plantas, como por exemplo, a *Pantoea citrea* (Eggers *et al.*, 2004).

Genes semelhantes à ecotina bacteriana também foram identificados em tripanossomatídeos, tendo sido descritos três genes em *L. major* e denominados Inibidores de Serino Proteases: *ISP1*, *ISP2* e *ISP3*. Gene homólogo ao *ISP2* foi identificado em cópia única em *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*, *ISP1* também foi detectado em *T. brucei*, porém, o gene *ISP3* não está presente em ambas as espécies. O alinhamento da sequência prevista de aminoácidos da ecotina com os três ISPs de *L. major* demonstrou similaridade com a porção N-terminal e sítios de ligação ao substrato altamente conservados, obtendo identidade de 32% para *ISP1* e *ISP2* e 30% para *ISP3* com a ecotina bacteriana (Eschenlauer *et al.*, 2009). Considerando que serino proteases da família S1A não estão presentes no genoma de tripanossomatídeos, assume-se que o possível papel dos ISPs seria a inibição de proteases do hospedeiro.

Experimentos com *Leishmania major* deficientes em *ISP1/2/3* ($\Delta isp1/2/3$) demonstraram que os parasitos mutantes apresentam morfologia alterada, como flagelos aparentemente mais curtos, distensão da bolsa flagelar e secreção de vesículas. A reexpressão do *ISP1* restaurou o fenótipo do flagelo, sugerindo que *ISP1* possui um papel na dinâmica da bolsa flagelar e diferenciação de promastigotas (Morisson *et al.*, 2012). Já ensaios de infecção *in vitro* com parasitos deficientes em *ISP2* e *ISP3* ($\Delta isp2/3$) demonstraram que são mais facilmente fagocitados por macrófagos de camundongos BALB/C e C57BL/6 em 3 horas de infecção, em comparação com os parasitos selvagens ou os que reexpressam os inibidores *ISP2/3*. Contudo, após 24 horas são parcialmente eliminados, sugerindo que a sobrevivência da *L. major* em macrófagos depende em parte da atividade do *ISP2/3* (Eschenlauer *et al.*, 2009; Faria *et al.*, 2011).

Demonstramos que a internalização destes parasitos foi diminuída na presença de *ISP2* recombinante (*ISP2r*) ou um inibidor específico e irreversível de NE (NEi). Ao adicionar NE exógena à infecção por parasitos selvagens, houve um aumento no número das *Leishmanias* no interior dos macrófagos, sugerindo que a NE estimula a fagocitose (Faria *et al.*, 2011). Após a entrada na célula, os parasitos mutantes $\Delta isp2/3$ apresentam sobrevivência reduzida em comparação com os parasitos selvagens, sugerindo que a atividade da NE está envolvida com a redução do número de parasitos em macrófagos. Quando a infecção é realizada na presença

de anticorpos neutralizantes para os receptores do tipo Toll 2 (TLR2) ou Toll 4 (TLR4), observamos que os parasitos sobrevivem, indicando que os esses receptores também contribuem para a redução da sobrevivência dos parasitos. Postulamos que a NE está relacionada com a ativação de TLR2 e TLR4. Uma vez que esses receptores são ativados, há a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), promovendo a eliminação das *Leishmanias* (Faria *et al.*, 2011). Em paralelo ocorre a ativação da Proteína Quinase R (PKR), esta levará à expressão das citocinas inflamatórias TNF- α e INF- β e de óxido nítrico, que contribuem para a eliminação do parasito. Além disso, parasitos $\Delta isp2/3$ apresentam uma multiplicação intracelular retardada em comparação com parasitos selvagens após 48h (Faria *et al.*, 2011, 2014). Portanto, em infecções por *Leishmania major*, o ISP2 demonstrou ser um importante fator de virulência, pois ao inibir a NE contribui para o estabelecimento da infecção.

2 JUSTIFICATIVA

Milhões de pessoas são acometidas por leishmaniose anualmente, estimando-se 30 mil mortes por ano (WHO, 2016). Apesar de intensos estudos, Antimoniais Pentavalentes continuam sendo as drogas de primeira linha no combate à doença desde a sua implantação em 1940 (Cardoso *et al.*, 2014). Alta toxicidade, eficácia questionável e a crescente resistência adquirida pelos parasitos às drogas existentes tem impulsionado a busca por novos fármacos. O envolvimento direto ou indireto de proteases na sobrevivência e virulência de diversos patógenos redirecionou estudos para a formulação de compostos no tratamento de doenças, atuando como potencial alvo terapêutico.

Inibidores de proteases têm sido descritos em diversos microrganismos que parasitam o homem, atuando no controle de proteases endógenas ou do hospedeiro. Eggers *et al.*, 2004, demonstraram que a ecotina, inibidor de serino proteases expresso pela *Escherichia coli*, inibe a elastase neutrofílica, impedindo assim, a morte da bactéria pelo sistema imune do hospedeiro. Inibidores ortólogos à ecotina bacteriana foram descritos em *Leishmania major* e denominados *ISP1*, *ISP2* e *ISP3* (Eschenlauer *et al.*, 2009). Nosso grupo demonstrou que o *ISP2* é um importante fator de virulência da *L. major*, pois atua inibindo a elastase neutrofílica, modulando a entrada e sobrevivência do parasito na célula (Faria *et al.*, 2011). Entretanto, nas formas promastigotas da *L. donovani*, causadora da leishmaniose visceral, não detectamos a expressão de *ISP2*. Em ensaios de infecção *in vitro* e *in vivo*, o crescimento da *L. donovani* foi reduzido tanto na presença de um inibidor sintético da NE (NEi), como na infecção de camundongos deficientes em elastase (*ela2^{-/-}*). Estes resultados indicam que na infecção por *L. donovani*, a ausência do *ISP2* contribui para a infecção, por permitir que a via de sinalização celular NE-TLR4-TLR2 permaneça ativada, garantindo a sobrevivência dos parasitos no interior dos macrófagos (Dias, 2015).

A fim de investigar como a relação *ISP2*-NE se apresenta nas diferentes espécies viscerotrópicas, neste trabalho avaliaremos a expressão do *ISP2* em *L. i. chagasi* e ensaios de infecção *in vitro* e *in vivo* serão realizados para análise da sobrevivência do parasito na presença e ausência da NE.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar o possível papel da elastase neutrofílica na infecção pela *L. i. chagasi* NCL, agente causador da leishmaniose visceral.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a presença e expressão do ISP2 pela *Leishmania i. chagasi* NCL nas formas promastigotas;
2. Através de ensaios *in vitro*, avaliar a influência da elastase neutrofílica na infecção pela *L. i. chagasi* NCL em macrófagos murinos na presença de inibidor farmacológico;
3. Avaliar a sobrevivência de *L. i. chagasi* NCL em macrófagos deficientes em elastase neutrofílica;
4. Investigar a possível participação da elastase neutrofílica nas infecções *in vivo* por *L. i. chagasi* NCL;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos deficientes em elastase neutrofílica (*ela2^{-/-}*) cedidos pelo Dr. Jeremy Mottram, da Universidade de York, Inglaterra, e C57BL/6 provenientes do Laboratório de Animais Transgênicos (LAT-UFRJ). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas éticas aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF 34/2015.

4.2 Parasitos

Neste estudo foram utilizadas promastigotas de *Leishmania i. chagasi* NCL cedidas pela Dra. Bartira Bergmann, Laboratório de Imunofarmacologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil. Promastigotas de *Leishmania major* Friedlin (MHOM/JL/80/Friedlin) selvagens, deficientes nos genes *ISP2/ISP3* ($\Delta isp2/isp3$) e *L. donovani* isoladas de um paciente do Sudão, foram cedidas pelo Dr. Jeremy Mottram, da Universidade de York, Inglaterra. Foi utilizada, também, a cepa LV9 de *L. donovani* cedida pelo Dr. Paul Kaye da Universidade de York, Inglaterra.

As diferentes espécies de *Leishmania* foram cultivadas em meio *Eagle* modificado, denominado meio Homem (Invitrogen) incluindo 10% de soro fetal bovino LGC inativado, a 25°C conforme descrito (Hilley *et al.*, 2000). As culturas foram repicadas uma vez por semana.

4.3 Western Blotting

7×10^6 promastigotas de *L. i. chagasi* NCL, *L. major* selvagem (Friedlin), *L. major* transgênica $\Delta isp2/3$ (cujos genes *ISP2* e *ISP3* foram removidos do genoma, Eschenlauer *et al.*, 2009), *L. donovani* Sudan (MW897), *L. donovani* transgênica (cujo o gene *ISP2* da *L. major* foi inserido em seu locus ribossomal, Dias, 2015) e *L. donovani* LV9 foram lavadas duas vezes em Solução Salina Balanceada de Hanks (HBSS) para remoção do meio de cultura, centrifugadas a 10.000 RPM por 2 minutos e lisadas em tampão de SDS-PAGE (glicerol, 10%; azul de bromofenol, 0.02%; 100µM de β-mercaptoetanol; SDS 2%) juntamente com Salina Tamponada com Fosfato monobásico de sódio (PBS). Utilizou-se *ISP2* recombinante (produção descrita em Eschenlauer *et al.*, 2009) como controle positivo juntamente com *Leishmania major* selvagem.

Os lisados foram fervidos por 5 minutos antes de serem aplicados no gel de poli-acrilamida 14% (gel de separação: acrilamida 14 %, solução de acrilamida-bisacrilamida (30:0,8), Tris-HCl, 1,5 M (pH 8,8); SDS, 10%; persulfato de amônia, 10 % e TEMED) e gel de concentração: acrilamida-bisacrilamida (30:0,8%); Tris-HCl, 1M (pH 6,8); SDS, 10%; persulfato de amônia, 10% e TEMED) para separação das proteínas por peso molecular

através de eletroforese. O tampão utilizado durante a corrida continha Tris-HCL, 25 mM; glicina, 192 mM; SDS, 0,1% e a voltagem se manteve constante em 100mV.

As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em um tampão de transferência constituído de Tris-HCL, 25mM; glicina, 192mM; 200mL de metanol, a 100mV durante 50 minutos. O bloqueio da membrana foi realizado com PBS 0.1% *Tween*, contendo 9% de leite Molico por 2 horas. Após a etapa de bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes com TBS-*Tween* 0,1% e posteriormente incubada *overnight* com soro policlonal anti-ISP2 (1:2.000) (produção descrita em Eschenlauer *et al.*, 2009) diluído em TBS-T 0,1%. Anti-ISP2 foi detectado usando anti-*sheep* IgG peroxidase (1:10.000) e visualizado pela adição do substrato quimioluminescente *SuperSignal West Pico* (Pierce), seguindo as instruções do fabricante. Ambos, ISP2 recombinante e anti-soro de ovelha anti-ISP2, foram cedidos pelo Dr. Jeremy Mottram, da Universidade de York, Inglaterra.

4.4 Infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais por *Leishmania i. chagasi* NCL

Macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 ou *ela2^{-/-}* foram recrutados após injeção de solução de tioglicolato de sódio 3% estéril na cavidade peritoneal. Após 3 dias, o lavado peritoneal foi recolhido, as células foram obtidas após centrifugação a 1000 x g, lavadas com HBSS e plaqueadas na concentração de 4×10^5 em placa de 24 poços contendo uma lamínula de 13mm. As células foram mantidas em cultura por 24 horas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) Gibco inativado. As culturas foram lavadas três vezes com solução salina (HBSS) para retirada das células não aderentes e incubadas com promastigotas (5 dias de cultura) em meio RPMI 1% (v/v) de BSA, a uma proporção de cinco parasitos para cada macrófago. Após 3 horas de interação a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, todos os poços foram lavados três vezes com HBSS para remoção dos parasitos extracelulares. Os pontos de 3 horas foram fixados com metanol 70% e corados com Giemsa (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). Parte da cultura foi mantida a 37°C por mais 24, 48 ou 72 horas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, seguidas de fixação e coloração, para análise da sobrevivência dos parasitos. A quantificação do número de parasitos intracelulares deu-se por observação em microscópio óptico (Zeiss).

Quando indicado, um inibidor sintético específico e irreversível da elastase neutrofílica (NEi) MeOSuc-AAPA-CMK (*Calbiochem*) foi adicionado na concentração de 10 μ M (Faria, 2009), 5 minutos antes da adição dos parasitos e deixados na cultura durante as 3 primeiras horas de interação. As culturas foram lavadas após as 3 horas para retirada dos parasitos extracelulares. Nos ensaios indicados, adicionou-se NE purificada exógena (*Calbiochem*) na concentração de 200 ng/mL (Faria, 2009). As células foram cultivadas por mais 24h, 48h e 72 horas em meio RPMI com 10% de SFB Gibco inativado. Após cada tempo de infecção, as células foram fixadas e coradas. Realizou-se a quantificação do número de parasitos intracelulares por microscopia óptica, contando-se pelo menos 100 células em cada triplicata.

4.5 Ensaios de infecção *in vivo* por *Leishmania i. chagasi*

4.5.1 Infecção de camundongos

3×10^7 promastigotas foram ressuspensas em 30 μ L de PBS e inoculadas no plexo retro-orbital de camundongos C56BL/6 ou deficientes em elastase neutrofílica (*ela2^{-/-}*). Os grupos experimentais foram compostos por 5 camundongos cada. Após 7 dias de infecção, os animais foram eutanasiados e houve a extração de fígado e baço para análise da carga parasitária.

4.5.2 Avaliação da Carga Parasitária do baço

Realizou-se a pesagem dos baços extraídos e posterior maceramento em 2 mL de meio Homem. Em placa de 48 poços, foram realizadas três diluições seriadas de 1:10, 1:100 e 1:1000 para cada órgão em meio Homem 10% de SFB LGC inativado. A placa foi mantida em cultura a 26 °C para diferenciação em formas promastigotas. A quantificação dos parasitos foi realizada após 7 dias através de microscopia óptica, utilizando câmara de Neubauer (Bradley e Kirkley, 1977; Bradley, 1977).

4.5.3 Avaliação da Carga Parasitária do fígado.

Os fígados foram pesados e, em seguida, macerados através de *Cell Strainer* em meio Homem. Utilizando placas de 96 poços de fundo chato, realizou-se 24 diluições seriadas de 1:3 para cada órgão em meio Homem 10% de SFB LGC inativado. As placas foram incubadas a 26°C para diferenciação em formas promastigotas. A quantificação dos parasitos foi realizada após 7 dias através de microscopia óptica, utilizando câmara de Neubauer (Bradley e Kirkley, 1977; Bradley, 1977).

4.6 Análise estatística

O programa *GraphPad Prism* foi utilizado para análise estatística. Os valores são representados pela média e o desvio padrão. One-Way ANOVA determinam as análises estatísticas entre os valores de média dos grupos de ensaio de infecção *in vitro* e *in vivo* (Two-Way ANOVA) pelo teste de análise de variância, usando como pós-teste Bonferroni e nível de significância de 5%.

4.7 Curva de crescimento de *L. i. chagasi* *in vitro*

A fim de analisar o crescimento da *L. i. chagasi in vitro*, 2×10^6 parasitos por mL foram diluídos em meio Homem 10% de SFB LGC em garrafa para cultivo celular de 25cm² (NEST) e, esta, foi mantida em estufa a 27°C. O crescimento foi acompanhado durante 7 dias através de contagem do número de parasitos em câmara de Neubauer. O experimento foi realizado em duplicata.

4.8 Análise morfológica de *L. i. chagasi* por microscopia óptica

Para facilitar a aderência dos parasitos à lamínula, esta foi revestida com poli-L-lisina (Sigma) durante 30 minutos. Após este tempo, as lamínulas foram lavadas duas vezes com água apirogênica e, em seguida, 100uL de cultura de *Leishmania* suspensas em PBS foi adicionado para adsorção dos parasitos. Após 30 minutos, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS e coradas com Giemsa (20 minutos) para análise em microscópio óptico.

5 RESULTADOS

5.1 A expressão do ISP2 não foi detectada em *L. i. chagasi* através da técnica de *Western blotting*

Inibidores de serino proteases S1A foram descritos em *Leishmania major*, espécie causadora da leishmaniose cutânea, e denominados ISPs. Nosso grupo demonstrou que o ISP2 de *L. major* modula a entrada e sobrevivência do parasito no interior de macrófagos murinos pela inibição da elastase neutrofílica (Faria *et al.*, 2011). O oposto foi demonstrado em *L. donovani*, espécie causadora da leishmaniose visceral, que não expressa o ISP2 permitindo que a NE contribua para a ativação de receptores do tipo Toll 2 e 4, beneficiando sua sobrevivência e crescimento no interior de macrófagos (Dias, 2015).

A avaliação *in silico* do genoma da cepa de referência JPCM5 presente no banco de dados (GeneDB), revelou que o gene *ISP2* está presente no genoma de *L. i. chagasi* e não apresenta deleções, estando com a fase aberta de leitura intacta. Realizamos, então, a técnica de *Western blotting* para análise da expressão do ISP2 em diferentes linhagens de *Leishmania* sp. *L. major* selvagem, ISP2 recombinante e as cepas transgênicas de *L. donovani:ISP2* foram utilizadas como controle positivo, enquanto que *L. major* Δ *isp2/3* e *L. donovani* (MW897 e LV9) como controle negativo. A expressão do ISP2 (~ 17kDa) não foi detectada em *L. i. chagasi*, sugerindo que ela pode não expressar o inibidor ou expressar em níveis não detectáveis.

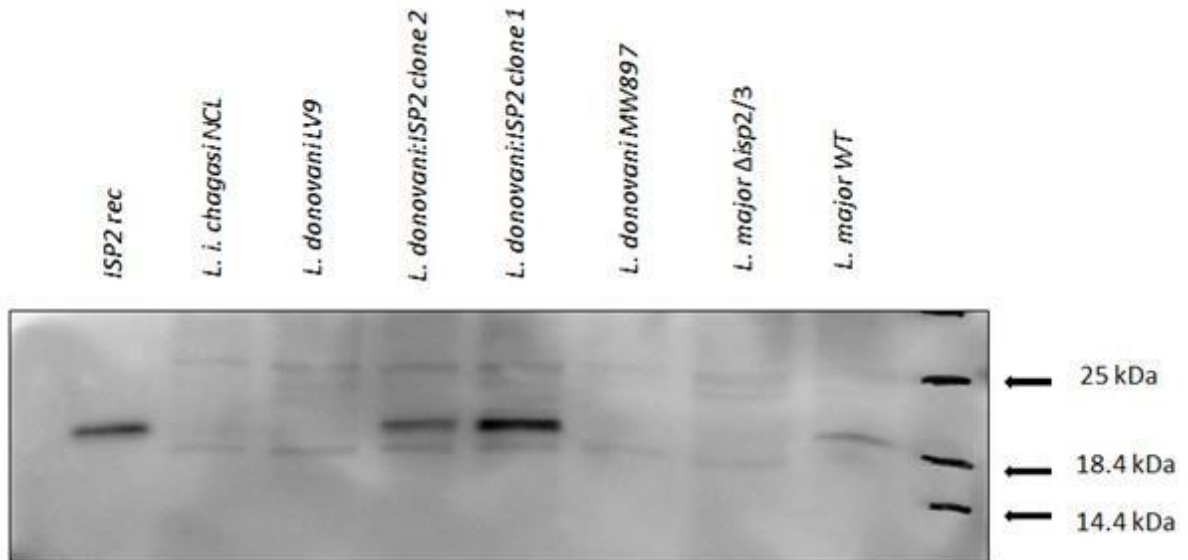


Figura 3 - A expressão do ISP2 não foi detectada em *L. i. chagasi*. Proteína recombinante ISP2 (rISP2) e 7×10^6 promastigotas de *L. chagasi* NCL, *L. major* selvagem, *L. major* Δisp2/3, *L. donovani* LV9, *L. donovani* MW897 e parasitos transgênicos *L. donovani*:ISP2 foram lisadas e aplicadas em gel de poliacrilamida 14%. As proteínas foram resolvidas por SDS-PAGE. Utilizou-se anticorpo primários anti-ISP2 (1:2000) e, este, foi detectado usando anti-sheepIgG-peroxidase (1:10000). A visualização das bandas deu-se pela adição do substrato quimioluminescente.

5.2 A inibição da elastase neutrofílica promoveu fenótipos divergentes na infecção pela *Leishmania i. chagasi* em 72h de infecção

Considerando a não detecção do ISP2 pela *L. i. chagasi* e a importância da elastase neutrofílica para o sucesso da infecção pela *Leishmania donovani*, nos questionamos qual seria o papel desta protease na infecção pela *L. i. chagasi*, espécie também associada aos quadros de leishmaniose visceral.

Realizamos ensaios de infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais provenientes de camundongos C57BL/6 recrutados com tioglicolato 3% de sódio na presença de um inibidor sintético específico e irreversível de elastase neutrofílica (NEi), a fim de observar se a inibição da NE conduziria a mudanças na infecção pelo parasito. Na figura 4A observamos que, na ausência de NEi, houve uma redução significativa no número de parasitos no interior dos macrófagos em 72h de infecção, quando comparado ao número de parasitos fagocitados em 3h, evidenciando que há morte de grande proporção dos parasitos internalizados, que pode ter sido seguida ou não de proliferação dentro de 3 dias. Quando o inibidor foi adicionado anteriormente à fagocitose, houve redução na internalização dos parasitos em 3h de infecção, seguido do aumento no número de parasitos em 72h. Essas observações sugerem que a inibição da NE conduz a uma redução da fagocitose da *Leishmania infantum chagasi* pelo macrófago, porém, os parasitos que são fagocitados conseguem crescer eficientemente, levando a um número maior de parasitos em 72h quando comparado ao ensaio na ausência do inibidor. Ao repetirmos os experimentos mais vezes, observamos por vezes resultados que não reproduziam a observação demonstrada em 4A. Tal divergência está ilustrada na figura 4B. Inicialmente observamos consistentemente redução no número de parasitos no interior dos macrófagos em 72h de infecção, em comparação a 3h, na ausência de NEi. Porém, quando adicionado NEi, o fenótipo foi oposto ao observado na figura A, apresentando dados similares ao da infecção na ausência do inibidor, sugerindo que a NE não influencia a infecção pela *L. i. chagasi*.

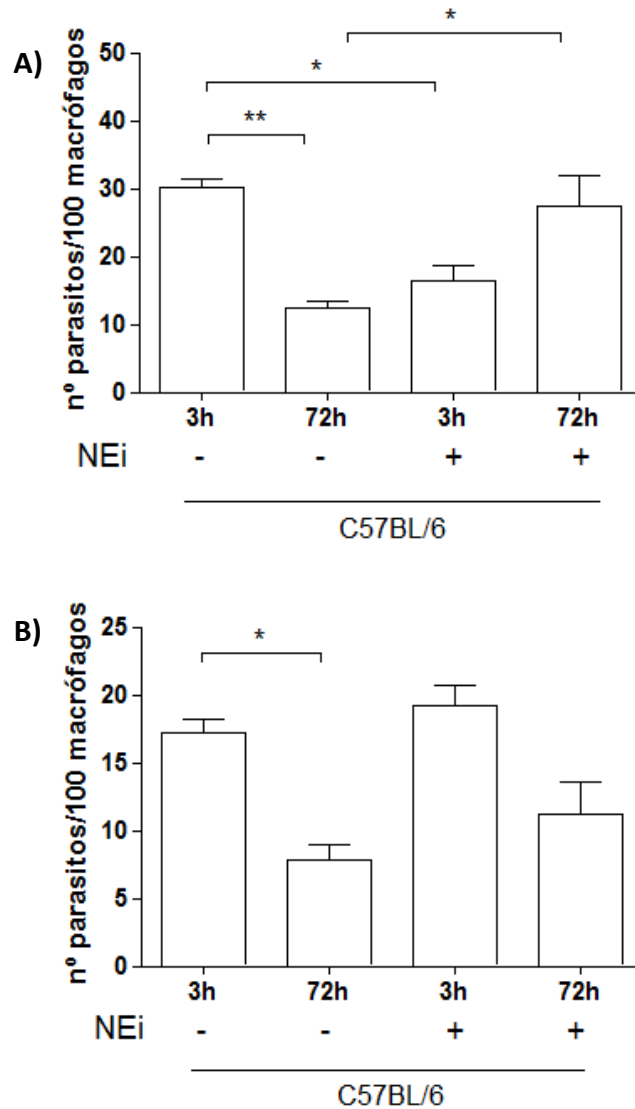


Figura 4 - A inibição da elastase neutrofílica conduziu a fenótipos controversos em 72h de infecção. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram incubados com promastigotas do dia 4 de cultivo em meio RPMI 1% de BSA, a uma proporção de 5 parasitos para cada macrófago. Quando indicado, foi adicionado um inibidor irreversível e específico para a elastase neutrofílica (NEi) 5 minutos antes da adição dos parasitos. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os gráficos **A** (n=2) e **B** (n=3) comparam os fenótipos da infecção quando a NE está inibida e ilustram as divergências de resultados obtidos dentre os 5 experimentos independentes. (*) indica diferença significativa de $p < 0,05$ e (**) de $p < 0,01$.

5.3 Na ausência da elastase neutrofílica há um aumento do número de parasitos em 72h de infecção?

Realizamos ensaios de infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais recrutados com tioglicolato 3% de sódio de camundongos *ela2^{-/-}* e seu *background* genético C57BL/6, no intuito de analisar a contribuição da NE no fenótipo da infecção por *L. i. chagasi*. Na figura 5A nota-se um aumento significativo no número de parasitos no interior dos macrófagos deficientes no gene que codifica a NE, sugerindo que na sua ausência possa haver um aumento da sobrevivência destes parasitos, como observado em *L. major* (Faria *et al.*, 2011) e nos resultados descritos na Fig 4A, onde utilizou-se um inibidor irreversível de NE.

Diferentemente, na figura 5B observamos que não há diferenças no número de parasitos no interior dos macrófagos entre 3h e 72h de infecção, tanto em macrófagos provenientes de camundongos selvagens, quanto provenientes de camundongos deficientes em elastase neutrofílica. Além disso, em ambos os ensaios foi obtido números similares de parasitos dentro dos macrófagos em 3h de infecção, sugerindo que a ausência da NE não afeta a entrada do parasito, como observado em *L. major Δisp2/3* (Faria *et al.*, 2011).

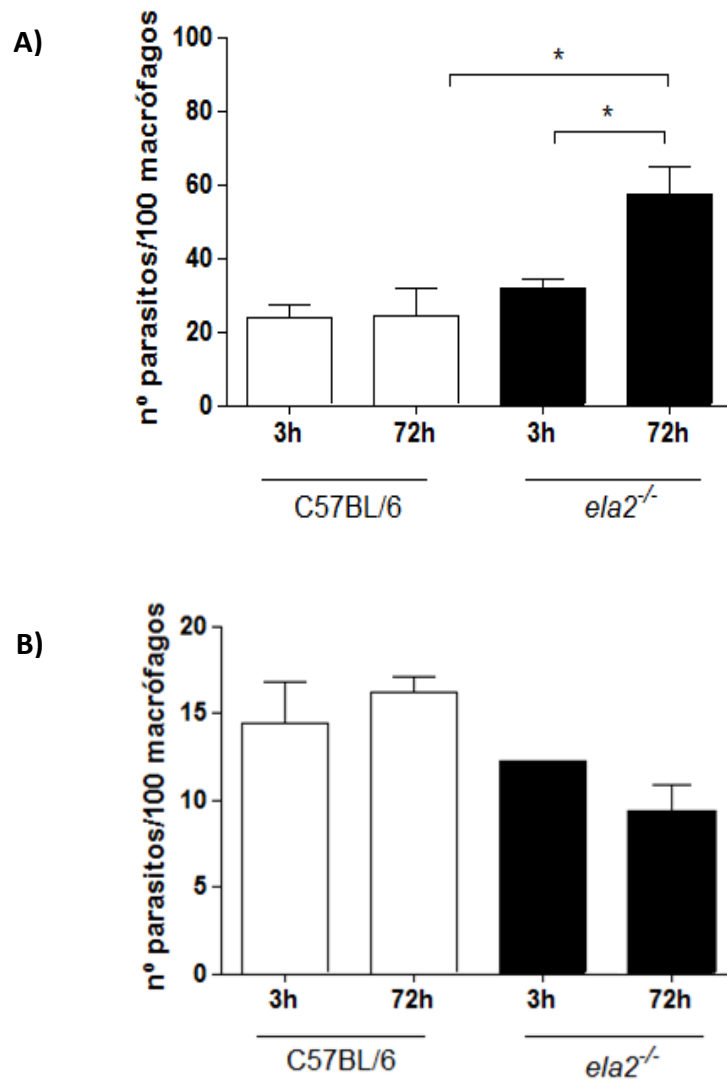


Figura 5 - Na ausência da elastase neutrofílica pode haver um aumento no número de parasitos no interior dos macrófagos em 72h de infecção. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 ou de camundongos *ela2*^{-/-} foram incubados com promastigotas do dia 4 de cultivo em meio RPMI 1% de BSA, a uma proporção de 5 parasitos para cada macrófago. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os gráficos **A** (n=2) e **B** (n=2) comparam os fenótipos da infecção na ausência da NE e ilustram as divergências de resultados obtidos dentre os 4 experimentos independentes. Em **A**, (*) indica diferença significativa em relação à infecção pelo parasito em macrófagos deficientes em elastase neutrofílica de $p < 0,05$ após 72 horas de infecção.

5.4 A adição da elastase neutrofílica exógena ao ensaio reduziu significativamente o número de parasitos no interior de macrófagos C57BL/6 e *ela2*^{-/-} em 72h de infecção

A fim de observar se a atividade de NE de fato influencia a infecção de macrófagos e o crescimento intracelular da *L. i. chagasi*, testamos se a adição de NE exógena a macrófagos provenientes de camundongos *ela2*^{-/-} ocasionaria a reversão do fenótipo observado, ou se o excesso de NE em infecções de macrófagos peritoneais provenientes de camundongos C57BL/6 acentuaria o fenótipo.

Na figura 6A observamos que ao adicionar a NE exógena a macrófagos de C57BL/6, houve redução significativa no número de parasitos no interior dos macrófagos em 72h de infecção em comparação a macrófagos infectados que não receberam NE. Já em macrófagos *ela2*^{-/-} (figura 6B), não houve diferença significativa na proporção de parasitos em 3h e após 72h, indicando que não houve crescimento intracelular neste período. Há ainda a possibilidade de que uma alta proporção dos parasitos fagocitados após 3h tenha morrido em 24h e, os sobreviventes, se multiplicado em 72h, porém, não foi possível avaliar. No entanto, quando NE foi adicionada às culturas notamos aumento da internalização dos parasitos em 3h de infecção, seguida de redução significativa do número de parasitos no interior do macrófago em 72h, similar ao fenótipo observado em *L. major* Δ *isp2/3* (Faria *et al.*, 2011).

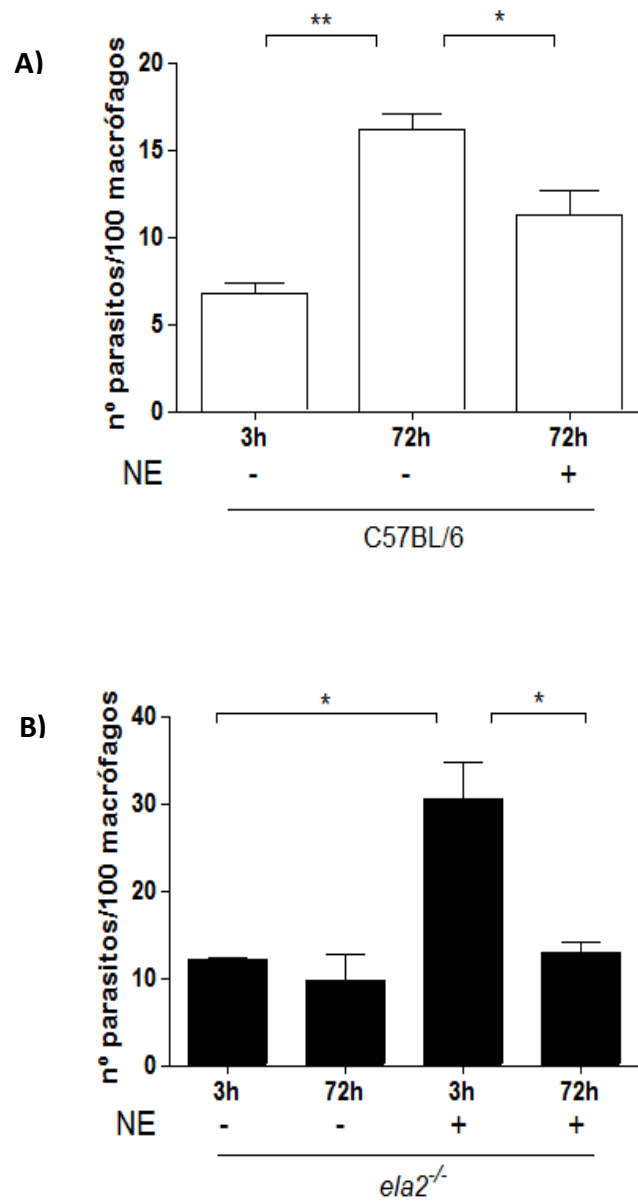


Figura 6 - A adição da elastase neutrofílica exógena conduziu a redução significativa do número de parasitos em 72h de infecção. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 (A) ou de camundongos *ela2*^{-/-} (B) foram incubados com promastigotas do dia 4 de cultivo, em meio RPMI 1% de BSA, a uma proporção de 5 parasitos para cada macrófago. Quando indicado, foi adicionada elastase neutrofílica purificada (NE) na concentração de 200 ng/mL. Os experimentos foram realizados em triplicata e 2 vezes independentes (n=2). (*) indica diferença significativa de p<0,05 e (**) de p<0,01.

5.5 Cinética da infecção de macrófagos murinos pela *L. i. chagasi*

No intuito de analisar a progressão da infecção no interior de macrófagos em diferentes tempos, realizamos a interação com os parasitos durante 3h e posteriormente, cultivamos por 24h, 48h e 72h. Na figura 7A observamos nas infecções de macrófagos provenientes de camundongos C57BL/6 na presença ou na ausência de NEi, alta taxa de internalização em 3h, seguida de morte intensa em 24h. Houve um discreto aumento do número de parasitos intracelulares entre 24h e 48h, sugerindo multiplicação dos parasitos sobreviventes. No entanto, este número se manteve similar em 72h, ou foi ligeiramente reduzido, sugerindo que os parasitos sobreviventes não foram capazes de se desenvolver plenamente no interior dos macrófagos. Na figura 7B, observamos que a morte dos parasitos é menos acentuada em 24h de infecção em macrófagos *ela2^{-/-}*, em relação aos macrófagos C57BL/6, porém, em ambas as populações de macrófagos observou-se a morte dos parasitos intracelulares ao longo das 72h.

A ausência de crescimento dos parasitos intracelulares em 72h sugerem que as condições dos ensaios realizados *in vitro* não foram ideais, seja pelos efeitos leishmanicidas das populações de macrófagos utilizadas ou pelas características da cepa do parasito mantida em cultura.

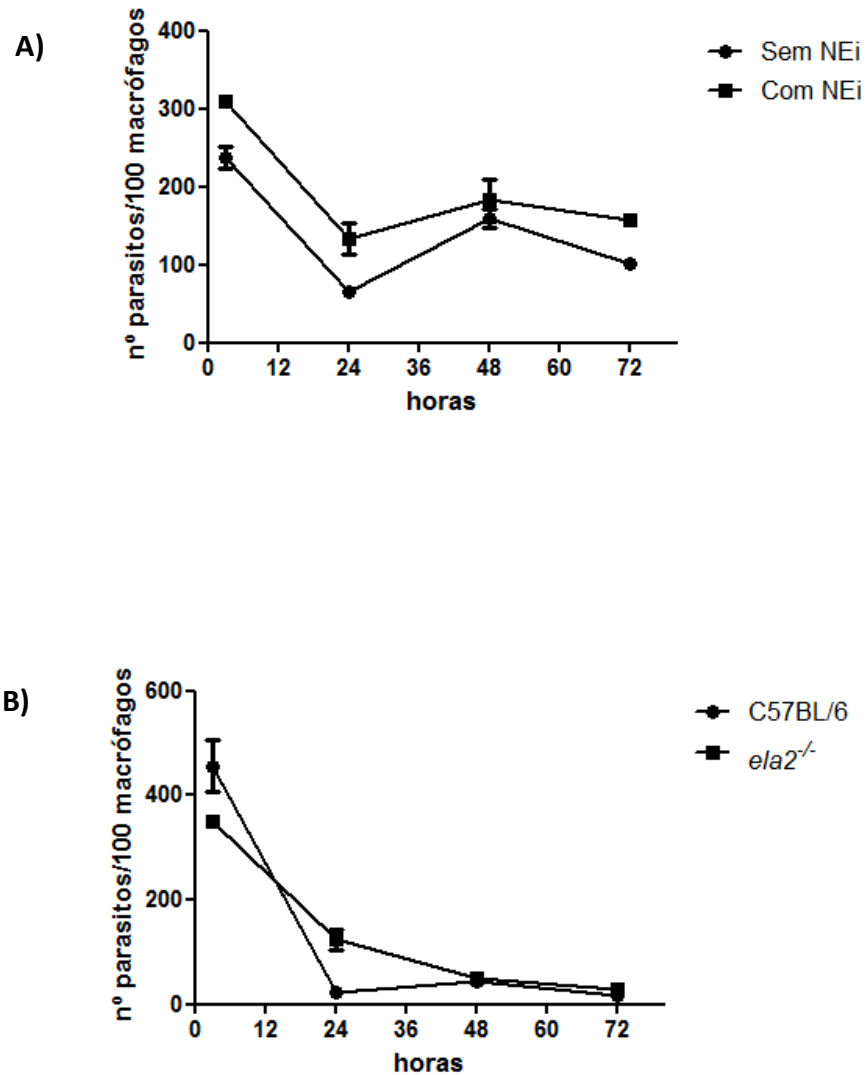


Figura 7 - Há ausência de crescimento da *L. i. chagasi* em macrófagos C57BL/6, tanto na presença quanto ausência de NEi, e em macrófagos *ela2*^{-/-} em 72h de infecção. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram incubados com promastigotas do dia 4 de cultivo em meio RPMI 1% de BSA, a uma proporção de 5 parasitos para cada macrófago. Em **A**, comparamos a progressão da infecção quando a NE está inibida e, Em **B**, quando a NE não está presente. Os experimentos foram realizados em triplicata e 2 vezes independentes para (**A**) e 3 vezes para (**B**). Os gráficos A (n=2) e B (n=2) ilustram os resultados obtidos dentre o total de experimentos independentes.

5.6 Na ausência da elastase neutrofílica há maior carga parasitária no baço de animais *ela2*^{-/-}

Em seguida, visamos avaliar se os parasitos cultivados seriam capazes de induzir leishmaniose visceral *in vivo* e concomitantemente, avaliar como a NE influenciaria a infecção. Para tal, inoculamos 3×10^7 promastigotas no plexo retro-orbital de camundongos C57BL/6 e *ela2*^{-/-} e, após 7 dias de infecção, os animais foram eutanasiados e a carga parasitária de fígado e baço foi quantificada por diluição limitante.

Observamos que os parasitos foram capazes de estabelecer infecções produtivas tanto em camundongos C57BL/6 quanto *ela2*^{-/-}, indicando que os fenômenos de eliminação dos parasitos intracelulares observados nos ensaios *in vitro* em macrófagos não resultam de uma possível avirulência da cepa de *L. i. chagasi* mantida em cultura. A figura 8A representa a carga parasitária no baço. Observamos um aumento significativo no número de parasitos no baço de animais que não expressam a NE, sugerindo que a NE contribua no controle da infecção inicial no baço pela *L. i. chagasi*. No fígado, observamos a tendência à diminuição da carga parasitária em animais *ela2*^{-/-} (figura 8B). No entanto, devido à variação observada na carga parasitária em camundongos C57BL/6, não foi observada diferença significativamente estatística.

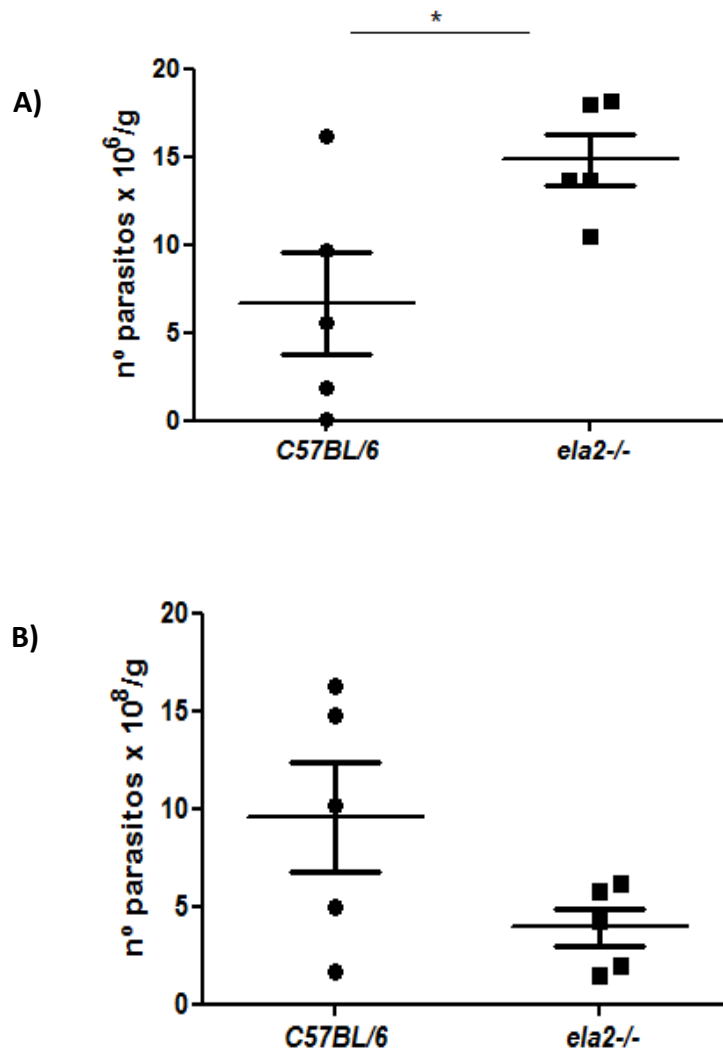


Figura 8 - A ausência da elastase neutrofílica conduz a um aumento significativo no número de parasitos no baço de animais *ela2*^{-/-}. A) Representa a carga parasitária no baço e B) no fígado. Promastigotas de *L. i. chagasi* NCL do dia 4 de cultivo foram inoculadas na cavidade retro-orbital de camundongos C57BL/6 ou *ela2*^{-/-} (3×10^7 parasitos/animal) em PBS. Após 7 dias, os camundongos foram sacrificados e a carga parasitária do baço (A) e do fígado (B) de camundongos infectados por *L. i. chagasi* NCL foi medida por diluição limitante. O experimento foi realizado 2 vezes independentes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando Two-way ANOVA. (*) indica diferença significativa de $p < 0,05$.

5.6 A *L. i. chagasi* promastigota não atingiu fase estacionária de crescimento nas culturas *in vitro*

Devido à grande divergência entre os resultados apresentados *in vitro* e *in vivo*, e das discrepâncias nas taxas de sobrevivência e crescimento intracelular dos parasitos nos macrófagos em diferentes ensaios *in vitro*, nos questionamos se a população de parasitos promastigotas obtidas no dia 4 de crescimento e utilizada nos ensaios estaria em fase estacionária e, por conseguinte, apresentando quantidades suficientes de formas metacíclicas no momento da infecção. Caso a proporção de metacíclicas fosse irrisória, a grande porcentagem de formas promastigotas procíclicas fagocitadas após 3 horas de interação seria eliminada pelos macrófagos murinos. Determinamos, portanto, a curva de crescimento da *L. i. chagasi* em cultura, a fim de acompanharmos a cinética nas condições utilizadas. Deste modo, o crescimento do parasito foi acompanhado durante 7 dias e observou-se que durante 6 dias a *Leishmania i. chagasi* continuou em fase exponencial, seguida de uma redução brusca no número de parasitos no sétimo dia, possivelmente devido ao esgotamento dos nutrientes do meio de cultura.

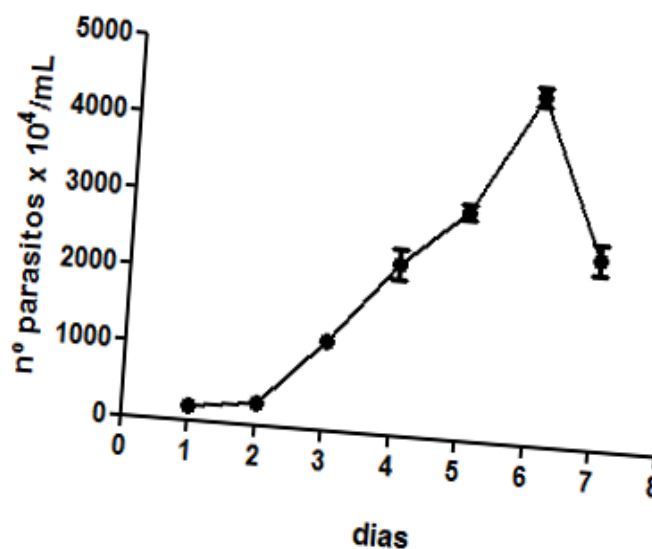


Figura 9 - Curva de crescimento de *L. i. chagasi* *in vitro*. 2×10^6 parasitos por mL foram diluídos em meio Homem 10% de SFB LGC em garrafa para cultivo celular e, esta, mantida em estufa a 27°C. O crescimento foi acompanhado durante 7 dias através de quantificação por microscopia óptica. O experimento foi realizado em duplicata.

5.7 Análise morfológica da *L. i. chagasi* por microscopia óptica

Seguindo a caracterização da população de parasitos mantida em cultura, avaliamos a morfologia das células. Parte da cultura foi fixada e aderida em lamínulas revestidas com poli-L-lisina, e corada com Giemsa, a fim de observar a predominância das formas promastigotas metacíclicas no quarto dia de cultura *in vitro*.

As setas vermelhas evidenciam as formas promastigotas procíclicas, predominantes em ambos os campos de imagem. Estas são maiores e possuem um corpo elipsoidal, enquanto que as setas laranjas indicam as formas promastigotas metacíclicas, que se diferem por apresentar um flagelo mais comprido, corpo menor e mais delgado (Bates, 1994).

Estes resultados demonstram que nas condições adotadas no laboratório, a *L. i. chagasi* não atingiu a fase estacionária e, portanto, a expectativa seria de um número muito reduzido de formas metacíclicas na população, que são as formas infectivas para o hospedeiro mamífero. Assim, as infecções realizadas neste estudo com parasitos obtidos no quarto dia de crescimento deram-se principalmente por formas procíclicas, sendo estas naturalmente incapazes de estabelecer infecção. Deste modo, a metodologia abordada até o momento terá de ser revista, realizando infecções *in vitro* e *in vivo* com formas metacíclicas purificadas.

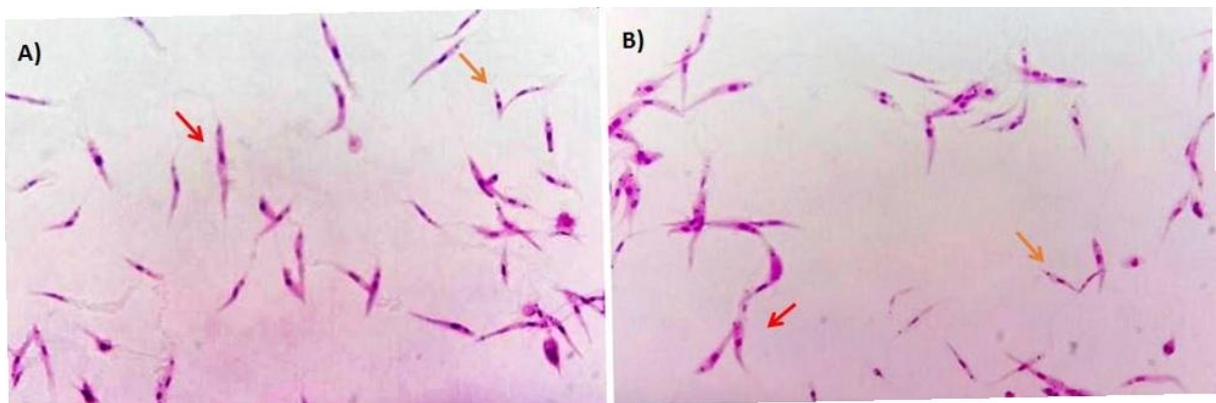


Figura 10 - Microscopia óptica das promastigotas de *L. i. chagasi*. Para facilitar a aderência dos parasitos à lamínula, esta foi revestida com poli-L-lisina durante 30 minutos. Promastigotas de *Leishmanias*, do quarto dia de cultivo, foram adsorvidas no filme de poli-L-lisina e posteriormente coradas com Giemsa para análise em microscópio óptico em objetiva de 100x. As setas em laranja indicam as formas promastigotas metacíclicas e as vermelhas indicam as formas promastigotas procíclicas.

6 DISCUSSÃO

A família S1A é a mais numerosa das serino proteases e são encontradas em diversos organismos. Os membros desta família possuem variadas funções fisiológicas relevantes em mamíferos e são potencialmente inibidas pelos ISPs. Os genes de ISP são semelhantes à ecotina descrita em *E.coli* e foi demonstrado que o ISP2 possui atividade inibitória contra tripsina, quimotripsina, NE e catepsina G. A ausência da ecotina implicou na redução da sobrevivência da *E. coli*, devido a maior permeabilidade da membrana externa ocasionada por ação da elastase neutofílica (Eggers *et al.*, 2004), evidenciando este inibidor como um importante fator de virulência em bactérias.

ISPs foram identificados nos tripanossomatídeos patogênicos, *ISP2* no *T. cruzi*, *ISP1* e *ISP2* em *T. brucei* e *ISP1*, *ISP2* e *ISP3* em *Leishmania* sp. Inicialmente os três genes de ISP foram descritos em *L. major* (Eschenlauer *et al.*, 2009) e se apresentam conservados nas espécies de *Leishmania* com genoma sequenciado até o momento. Devido a ausência de genes para proteases da família S1A em *Leishmania*, assume-se que os ISPs atuem inibindo proteases do hospedeiro. A expressão do *ISP1* foi detectada apenas nas formas promastigotas procíclicas e metacíclicas, enquanto o *ISP2* foi detectado também nas formas amastigotas, além de promastigotas procíclicas e metacíclicas (Eschenlauer *et al.*, 2009). A expressão de *ISP3* não foi detectada, e especula-se que possa ser um pseudogene ou que seja expresso somente em momentos específicos do ciclo evolutivo do parasito no flebotomíneo ou ainda tenha expressão induzida no hospedeiro mamífero. Sabendo da presença de enzimas semelhantes à tripsina e quimiotripsina no trato digestório do inseto vetor (Ramalho-Ortigao *et al.*, 2003), sugere-se que os ISPs também possuam papel ativo na sobrevivência do parasito neste meio, regulando positivamente sua expressão. No entanto, ensaios com as linhagens de *L. major* transgênicas deficientes em ISPs não revelaram nenhuma alteração na capacidade do parasito de estabelecer infecções em flebotomíneos (Morrison *et al.*, 2012). Em contraste, parasitos $\Delta isp1/2/3$ apresentaram problemas na diferenciação para formas metacíclicas e alterações morfológicas no flagelo e na bolsa flagelar, observando-se secreção de material amorfo da superfície celular e da extremidade do flagelo. O fenótipo foi revertido quando o *ISP1* foi reinserido no genoma, sendo estas alterações, portanto, atribuídas à ausência do *ISP1* (Morrison *et al.*, 2012). O *ISP2* exerce função sobre proteases do hospedeiro mamífero (Eschenlauer *et al.*, 2009).

Nosso grupo demonstrou que o ISP2 presente em *L. major* é um importante fator de virulência, pois parasitos transgênicos cujos genes *ISP2/ISP3* foram removidos do genoma por recombinação homóloga, apresentam redução da sobrevivência em macrófagos murinos, a qual foi atribuída à ação da NE (Eschenlauer *et al.*, 2009; Faria *et al.*, 2011). Vale ressaltar que a NE, além de neutrófilos, também é encontrada em monócitos e macrófagos, onde é genericamente chamada de HLE (human leukocyte elastase). Além disso, macrófagos peritoneais presentes em quadros de peritonite aguda são expostos a neutrófilos infiltrantes e provavelmente entraram em contato com produtos derivados da secreção e/ou morte de neutrófilos, dentre eles a própria NE. O oposto foi observado em *L. donovani*, espécie viscerotrópica, cuja expressão do ISP2 não foi detectada e na ausência da NE apresenta sobrevivência reduzida. Além disso, *L. donovani* transgênica que expressa o ISP2 devido a inserção do gene no locus ribossomal, são menos infectivas, sugerindo que a NE é requerida para o sucesso da infecção nestes parasitos (Dias, 2015). Devido a diferenças nos perfis de infecção de espécies cutâneas e viscerais, e a relação ISP2-NE possuindo papel importante para o estabelecimento da infecção, nos questionamos se a *L. i. chagasi* expressa o ISP2 e qual o possível papel da NE na infecção por esta espécie.

A cepa de referência JPCM5 da *Leishmania infantum* presente no banco de dados (GeneDB) apresenta a sequência para o ISP2 livre de *stop* codons, possibilitando sua expressão, diferentemente do observado na cepa referência de *L. donovani*. A comparação dos genomas foi incapaz de diferenciar *L. infantum* de *L. chagasi* (Kuhls *et al.*, 2013), sendo estabelecido o nome *L. infantum chagasi* para os casos ocorridos nas Américas. Sequenciamento do gene *ISP2* da cepa em estudo (*L. i. chagasi* NCL) foi realizado e observou-se 100% de similaridade com a cepa de referência e 92% de similaridade com o *ISP2* de *L. major* (dado não mostrado). Além disso, a fase de leitura aberta encontra-se intacta. Sabendo, portanto, que o gene está presente em *L. i. chagasi*, realizamos a técnica de *Western blotting* para avaliar a expressão do ISP2 pelo parasito. Assim como em *L. donovani*, a expressão do ISP2 não foi detectada nas formas promastigotas de *L. i. chagasi* (Fig. 3) e amastigotas (dado não mostrado). O ISP2 pode não ser expresso ou expresso em níveis não detectáveis. Há também a possibilidade de que o RNAm ou a proteína estejam sendo direcionados para alguma via de degradação, por ação da maquinaria de regulação pós-transcricional da *Leishmania* (Clayton e Shapira, 2007). Deste modo, surgiu a hipótese de que a NE poderia ter um papel benéfico à *L. i. chagasi*, assim como observado em *L. donovani*, pois ambas são espécies associadas a doença visceral.

Ensaio de infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais provenientes de camundongos C57BL/6 revelaram resultados controversos. Ao adicionar um inibidor sintético específico e irreversível para NE (NEi) ao meio, ora a inibição da NE conduziu a um aumento no número de parasitos no interior dos macrófagos em 72h de infecção (Fig. 4A), sugerindo que a presença da NE dificulte a infecção pelo parasito, similar ao observado em *L. major* (Eschenlauer *et al.*, 2009; Faria *et al.*, 2011), ora não houve diferenças entre o ensaio controle e o ensaio na presença de NEi (Fig. 4B). A divergência entre os resultados pode talvez ser explicada por variações nas populações de macrófagos oriundas da peritonite experimental induzida, com níveis variados de NE ou ainda, e mais provavelmente, devido a diferenças em sua capacidade microbicida. Admitindo esta hipótese, macrófagos com poder microbicida maior seriam mais capazes de controlar o crescimento dos parasitos intracelulares e, nestes casos, preponderante sobre um possível efeito maléfico da NE no crescimento intracelular.

Para confirmar um possível efeito da NE no controle do desenvolvimento da infecção em macrófagos, realizamos ensaios com macrófagos peritoneais de camundongos cujos gene para a elastase neutrofílica foi removido do genoma (*ela2^{-/-}*). Novamente obtivemos resultados discrepantes, alguns em que na ausência da elastase não há diferenças no fenótipo da infecção (Fig. 5B) e outros em que sua ausência acarreta no aumento no número de parasitos no interior dos macrófagos em 72h (Fig. 5A), sugerindo que o perfil da infecção seja similar ao observado em *L. major*. Talvez a *L. i. chagasi* expresse o ISP2 em níveis reduzidos, impossibilitando sua detecção através de *Western blotting*, porém, estes níveis sejam suficientes para que a NE seja inibida de modo a possibilitar o estabelecimento da infecção sem grandes prejuízos para o parasito. Deste modo, variações intrínsecas nos níveis de expressão do ISP2 podem resultar em parasitos menos ou mais capazes de inibir a NE e, portanto, que se comportam de modo heterogêneo quanto ao controle da ativação da via NE-TLR4 em macrófagos. Vale ressaltar que a afinidade do ISP2 recombinante de *L. major* pela NE é cerca de 10-100 vezes menor do que a ecotina, sugerindo que variações na concentração local de ISP2 podem ser determinante para a inibição efetiva de serino proteases alvo no hospedeiro.

A fim de confirmar se o aumento da sobrevivência dos parasitos nos ensaios anteriores era, de fato, em decorrência da ausência da NE, realizamos ensaios de infecção *in vitro* em macrófagos peritoneais provenientes de camundongos C57BL/6 e *ela2^{-/-}* na presença de NE exógena. Observamos a reversão do fenótipo na presença da NE exógena tanto em ensaios de

macrófagos *ela2*^{-/-} (Fig. 6B), quanto em ensaios de seu *background* genético (Fig. 6A). Além disso, houve um aumento significativo na internalização dos parasitos em 3h de infecção em macrófagos *ela2*^{-/-}, sugerindo que a NE também atue modulando a entrada/fagocitose dos parasitos. A princípio, o aumento da fagocitose dos parasitos pelos macrófagos seria benéfico para a *Leishmania*, porém, observamos uma redução parcial no número de parasitos no interior dos macrófagos em 72h. Estes resultados corroboram o observado em infecções pelos parasitos transgênicos de *L. major* Δ *isp2/3*, em que na ausência do ISP2, a NE se encontra livre e contribui para ativação de receptores do tipo TLR2 e 4, levando a diferentes cascatas de sinalização que culminam na morte do parasito no interior dos macrófagos.

Realizamos infecção de camundongos C57BL/6 e *ela2*^{-/-} com *L. i. chagasi*, a fim de avaliar o contexto *in vivo* da infecção. Após sete dias, os animais foram sacrificados, fígado e baço foram extraídos para análise da carga parasitária por diluição limitante. Observamos um aumento significativo no número de parasitos no baço de animais deficientes na produção de NE (Fig. 8A), sugerindo que na sua ausência há um favorecimento da infecção pela *Leishmania*, corroborando alguns dos resultados obtidos anteriormente nos ensaios *in vitro*. No fígado observamos que na ausência da NE há redução da carga parasitária em comparação aos camundongos selvagens, gerando um dado controverso (Fig. 8B). Respostas imunes específicas nos diferentes órgãos foram caracterizadas em infecções experimentais por *L. donovani*, apresentando uma infecção aguda, resistente a reinfecção e de mínimo dano tecidual, gerando formação de granulomas no fígado. No baço há persistência do parasito, falha na formação do granuloma e grande dano tecidual (Revisto por Stanley e Engwerda, 2007). A diferença da população de células e padrão de expressão de citocinas em ambos os órgãos possui um papel importante no controle da infecção, sendo essencial a formação do granuloma no fígado para a contenção dos parasitos. Os resultados apresentados sugerem que a NE seja requerida para o controle da infecção no baço, em contrapartida, sua ausência levou a uma redução da carga parasitária no fígado. Nesse contexto, propõe-se que a ausência da NE proporcione uma modulação diferenciada da resposta imune inata nos diferentes órgãos, e possivelmente com reflexos na resposta adaptativa, de modo que favoreça a persistência do parasito no baço ao passo que desfavoreça a sua sobrevivência no fígado, mesmo em períodos anteriores à formação de granulomas de resolução.

Apesar da detecção de parasitos no macerado de fígado nos primeiros dias de cultivo *in vitro*, observamos, ao longo do tempo de uma semana em cultura, promastigotas debilitadas

que não conseguiam sobreviver, impossibilitando a quantificação acurada da carga parasitária no fígado. Deste modo, acreditamos que os parasitos apresentaram dificuldade para se adaptar ao cultivo *in vitro* após passagem *in vivo*. O experimento foi realizado duas vezes independentes e, em ambos, a quantificação da carga parasitária do fígado não foi satisfatória, sendo necessária outra abordagem metodológica. A metodologia mais utilizada para quantificação da carga parasitária no fígado é o “*inprinting*” do órgão em lâmina, onde as células são posteriormente coradas e contadas em microscópio óptico. A quantificação da carga parasitária nos órgãos por diluição limitante mostrou-se adequada e satisfatória em infecções experimentais com *L. donovani*, gerando resultados confiáveis em uma metodologia menos trabalhosa (Dias, 2015). No entanto, evidenciamos que a cepa de *L. i. chagasi* é mais sensível às condições de manutenção *in vitro*, exigindo reformulação da metodologia de quantificação.

Dentre os experimentos *in vitro* realizados com macrófagos provenientes de camundongos *ela2^{-/-}* e C57BL/6 em que não observamos diferenças entre os ensaios controle e os ensaios de inibição ou ausência da NE, notamos que em 3h de infecção há uma alta internalização dos parasitos seguida da morte de 2/3 dos parasitos em 24h, se mantendo em níveis similares até 72h de infecção em ambos os ensaios (Fig. 7). A ausência de crescimento da *Leishmania* no interior dos macrófagos não representa o contexto real da infecção em que, após a fagocitose, o parasito se diferencia na forma amastigota e se multiplica no interior do fagolisossoma. Nos questionamos se as divergências observadas estariam relacionadas a problemas de diferenciação, surgindo a hipótese que diferentemente de outras espécies de *Leishmania* cultivadas no laboratório (*L. major*, *L. donovani*, *L. amazonensis*), a *L. i. chagasi* não atinge fase estacionária no quarto dia de crescimento em cultura.

O crescimento *in vitro* da *Leishmania* foi acompanhado durante sete dias, a partir da contagem diária do número de parasitos no mesmo horário. A curva de crescimento indicou que o parasito continua em fase exponencial até o sexto dia, seguido de uma morte brusca no sétimo dia devido ao provável esgotamento de nutrientes do meio de cultura (Fig. 9). Em paralelo, parasitos no quarto dia de cultivo foram fixados e corados para análise de sua morfologia por microscopia óptica. Foi observada maior predominância das formas promastigotas procíclicas, estando em torno de 77,5% na figura 10A e 68,3% na figura 10B, corroborando o observado na figura 9, em que o quarto dia de cultura não se mostrou o ideal para realização de infecções experimentais com parasitos provenientes direto da cultura, visto

que ele ainda se encontra em fase exponencial. A purificação das formas metacíclicas das populações obtidas do quarto dia de cultura foi realizada e demonstrou que apenas 1% era composto por promastigotas metacíclicas (dados não mostrados). Estes dados sugerem que o tempo ideal para obtenção de maior porcentagem seja entre o sexto e sétimo dia, fazendo-se necessário a purificação prévia das formas metacíclicas para a realização dos ensaios de infecção.

A metaciclogênese é um processo de transformação morfológica e fisiológica importante que confere infectividade ao parasito para o hospedeiro mamífero. As promastigotas metacíclicas se diferem na morfologia por apresentarem um flagelo mais comprido, alta motilidade, um corpo menor e mais delgado em comparação as formas promastigotas procíclicas (Bates, 1994). Além disso, há maior expressão ou expressão exclusiva de moléculas na superfície do parasito que conferem virulência, as melhores caracterizadas são LPG e gp63. A capacidade de aderir ao epitélio intestinal do vetor é característico das formas promastigotas procíclicas, que após metaciclogênese, são liberadas e alcançam a probóscide do inseto, sendo posteriormente disseminadas para outros hospedeiros. Esta liberação foi relacionada a modificações nos açúcares terminais de LPG (Pimenta *et al.*, 1992) ou mudanças conformacionais na molécula (Sacks *et al.*, 1995). Essas mudanças também conferem resistência às formas metacíclicas no hospedeiro mamífero, conferindo capacidade de modular a resposta imune oxidativa no interior dos macrófagos (Chan *et al.*, 1989), dentre outras funções. O aumento no grau de glicosilação de gp63 confere maior estabilidade à molécula, aumentando o grau de virulência nas formas metacíclicas (Kink e Chang, 1987). A gp63 está associada, por exemplo, à capacidade de evadir o sistema complemento e subverter a resposta imune ao seu favor, facilitando a fagocitose do parasito pelos macrófagos (Brittingham *et al.*, 1999).

Ambas as qualidades de evadir do sistema imune, tanto no meio extracelular quanto intracelular, contribuem para a sobrevivência do parasito, tornando LPG e gp63 moléculas essenciais para o estabelecimento da infecção da *Leishmania* no hospedeiro vertebrado. Portanto, a diferenciação em formas metacíclicas é essencial para o estabelecimento das infecções na célula hospedeira final, o macrófago. Deste modo, pretendemos realizar ensaios com as formas metacíclicas isoladas, a fim de ratificar as observações acerca do papel da NE em infecções com a *L. i. chagasi*.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam os problemas metodológicos a serem superados para obtenção de resultados conclusivos acerca do papel da elastase neutrofílica na infecção pela *L. i. chagasi*. A princípio, sugerimos que na infecção por *L. i. chagasi*, a modulação da atividade da NE é um fator importante para garantir a manutenção e estabelecimento da infecção, similar ao observado em *L. major*.

- ✓ A expressão do ISP2 não foi detectada em *L. i. chagasi*;
- ✓ A elastase neutrofílica parece modular a infecção pela *L. i. chagasi*, pois a sua inibição ou ausência promove aumento na sobrevivência do parasito;
- ✓ A elastase neutrofílica é requerida para o controle da infecção experimental no baço.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altamirano-Enciso, A.J., Marzochi, M.C.A., Moreira, J.S., Schubach, A.O. e Marzochi, K.B.F. On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre- and post-Colombian historical sources. (2003). *História, Ciências, Saúde Manguinhos* 10, 853-82.
- Ariel, A., Yavin, E.J, Hershkoviz, R., Avron, A., Franitza, S., Hardan, I., Cahalon, L., Fridkin, M., Lider, O. (1998). IL-2 induces T cell adherence to extracellular matrix: inhibition of adherence and migration by IL-2 peptides generated by leukocyte elastase. *J Immunol* 161, 2465-2472.
- Bedard, M., McClure, C.D., Schiller, N.L., Francoeur, C., Cantin, A., Denis, M. (1993). Release of interleukin-8, interleukin-6, and colony-stimulating factors by upper airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9, 455-462.
- Berman, J.D. (1988). Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev Infect Dis* 10, 560-86.
- Berman, J.D., Badaro, R., Thakur, C.P., Wasunna, K.M., Behbehani, K., Davidson, R., Kuzoe, F., Pang, L., Weerasuriya, K. e Bryceson, A.D.M. (1998). Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. *Bull World Health Organ* 76, 25–32.
- Bernier, R., Turco, S.J., Olivier, M. e Tremblay, M. (1995). Activation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Monocytoid Cells by the Protozoan Parasite *Leishmania donovani*. *Journal of Virology* 69, 7282-7285.
- Barret, A.J. (1994). Classification of Peptidases. *Methods in Enzimology* 244, 1-15.
- Barreto-de-Souza, V., Pacheco, G.J., Silva, A.R., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T., Saraiva, E.M. e Bou-Habib, D.C. (2006). Increased *Leishmania* replication in HIV-1–infected macrophages is mediated by tat protein through cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis. *Journal of infectious diseases* 194, 846-854.
- Bates, A.P. (1994). The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* 79, 215-8.
- Bertholet, S., Dickensheets, H.L., Sheikh, F., Gam, A.A., Donnelly, R.P. e Kenney, R.T. (2003). *Leishmania donovani*-Induced Expression of Suppressor of Cytokine Signaling 3 in Human Macrophages: a Novel Mechanism for Intracellular Parasite Suppression of Activation. *Infection and Immunity* 71, 2095-2101.
- Bradley, D.J. e Kirkley, J. (1977). Regulation of *Leishmania* populations within the host I. The variable course of *LEISHMANIA DONOVANI* infections in mice. *Clin exp Immunol* 30, 119-129.
- Bradley, D.J. (1977). Regulation of *Leishmania* populations within the host II. Genetic control of acute susceptibility of mice to *LEISHMANIA DONOVANI* infection. *Clin exp Immunol* 30, 130-140.
- Brittingham, A., Chen, G., McGwire, B.S., Chang, K-P. e Mosser, D.M. (1999). Interaction of *Leishmania* gp63 with Cellular Receptors for Fibronectin. *Infection and Immunity* 67, 4477-4484.
- BUS - Balaji Utthan Sansthan. History of Kala-azar. Disponível em: <http://www.bus.org.in/>. Acesso em 12/05/16.
- Cardoso, E.A., Silva, A.R., Carvalho, G.C., Fraga, A.G.M., Barbosa, M.L.C., Santos, A.L.S., Castro, H.C. e Lione, V. (2014). Leishmaniasis: History, Evolution of Treatment and the Need for New Drugs. *Current Biotechnology* 3, 2211-5501.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention (2013). Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/disease.html>. Acesso em 15/05/16.

- Chan, J., Fujira, T., Brennan, P., McNeil, M., Turco, S.J., Sibille, J., Snapper, M., Aisen, P. e Bloom, B.R. (1989). Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Nat. Acad Sc. US.* 86, 2453–2457
- Chung, C.H., Ives, H.E., Almeda, S. e Goldberg, A.L. (1983). Purification from *Escherichia coli* of a Periplasmic Protein that is a Potent Inhibitor of Pancreatic Proteases. *The Journal of Biological Chemistry* 258, 11032-11038.
- Clayton, C. e Shapira, M. (2007) Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Molecular and Biochemical Parasitology* 156, 93-101.
- Contreras, I., Gómez, M.A., Nguyen, O., Shio, M.T., McMaster, R.W. e Olivier, M. (2010). *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease gp63. *PLoS Pathog* 6, e1001148.
- Croft S.L., Neal, R.A., Pendergast, W. e Chan, J.H. (1987). The activity of alkylphosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem Pharmacol* 36, 2633–6.
- Cunningham, A.C. (2002). Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol* 72, 132-141.
- Desjardins, M. e Descoteaux, A. (1997). Inhibition of Phagolysosomal Biogenesis by the *Leishmania* Lipophosphoglycan. *J Exp Med* 185, 2061-2068.
- Dias, B.T. (2015). Identificação da elastase neutrofílica como agente promotor da infecção experimental por *Leishmania donovani*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Biofísica) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 93f.
- Ding, A.H., Nathan, C.F. e Stuehr, D.J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse to peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141, 2407-12.
- Eggers, C.T., Murray, I.A., Delmar, V.A., Day, A.G. e Craik, C.S. (2004). The periplasmic serine protease inhibitor ecotin protects bacteria against neutrophil elastase. *Biochem J* 379, 107-118.
- Eschenlauer, S.C., Faria, M.S., Morrison, L.S., Bland, N., Ribeiro-Gomes, F.L., Reis, G.A. e Mottram, J.C. (2009). Influence of parasite encoded inhibitors of serine peptidases in early infection of macrophages with *Leishmania major*. *Cellular microbiology* 11, 106-120.
- Faria, M.S.M. (2009). O papel dos inibidores de serino protease (ISPs) produzidos pela *Leishmania major* na interação parasito-hospedeiro. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Biofísica) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 117f.
- Faria, M.S., Reis, F.C., Azevedo-Pereira, R.L., Morrison, L.S., Mottram, J.C. e Lima, A.P.C. (2011). *Leishmania* inhibitor of serine peptidase 2 prevents TLR4 activation by neutrophil elastase promoting parasite survival in murine macrophages. *The Journal of Immunology* 186, 411-422.
- Faria, M.S., Calegari-Silva, T.C., Vivarini, A.C., Mottram, J.C., Lopes, U.G. e Lima, A.P.C. (2014). Role of protein kinase R in the killing of *Leishmania major* by macrophages in response to neutrophil elastase and TLR4 via TNF α and IFN β . *The FASEB Journal* 28, 3050-3063.
- Gantt, K.R., Schultz-Cherry, S., Rodriguez, N., Jeronimo, S.M., Nascimento, E.T., Goldman, T.L., Recker, T.J., Miller, M.A. e Wilson, M.E. (2003). Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *J Immunol* 170, 2613–2620.

- Garg, R., Barat, C., Ouellet, M., Lodge, R. e Tremblay, M.J. (2009). *Leishmania infantum* Amastigotes Enhance HIV-1 Production in Cocultures of Human Dendritic Cells and CD4+ T Cells by Inducing Secretion of IL-6 and TNF- α . PLoS Negl Trop Dis 3, e441.
- Gasser, R., Magill, A.J., Oster, C.N., Franke, E.D., Groggl, M. e Berman J.D. (1994). Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. Clin Infect Dis 18, 83-90.
- Giorgione, J.R., Turco, S.J. e Epanand, R.M. (1996). Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 11634–11639.
- Gomez, M.A., Contreras, I., Halle, M., Tremblay, M.L., McMaster, R.W. e Olivier, M. (2009) *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. Sci Signal 2, ra58.
- Guy, R.A., Belosevic, M. (1993). Comparison of Receptors Required for Entry of *Leishmania major* Amastigotes into Macrophages. Infection and Immunity 61, 1553-1558.
- Hassani, K., Shio, M.T., Martel, C., Faubert, D. e Olivier, M. (2014). Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of *Leishmania* exosomes. PLoS One 9, e95007.
- Hide, M., Bucheton, B., Kamhawi, S., Bras-Gonçalves, R., Sundar, S., Lemesre, J.L. e Bañuls, A.L. (2007). Understanding Human Leishmaniasis: The Need for an Integrated Approach. Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies. Michel Tibayrenc, editor Wiley & Sons, Inc., (USA, New Jersey), 87-123.
- Hilley, J.D., Zawadzki, J., McConville, M.J., Coombs, G.H. e Mottram, J.C. (2000). *Leishmania mexicana* mutants lacking glycosylphosphatidyl (GPI): protein transamidase provide insights into the biosynthesis and functions of GPI-anchored proteins. Mol Biol Cell 11, 1183-1195.
- Kevric, I., Cappel, M.A. e Keeling, J.H. (2015). New world and old world *Leishmania* infections: a practical review. Dermatologic clinics 33, 579-593.
- Kink, J.A., Chang, K.P. (1987). Biological and biochemical characterization of tunicamycin resistant *Leishmania mexicana*: mechanisms of drug resistance and virulence. Infect Immun 55, 1692-700.
- Kuhls, K., Alam, M.Z., Cupolillo, E., Ferreira, G.E., Mauricio, I.L., Oddone, R., Feliciangeli, M.D., Wirth, T., Miles, M.A. e Schönian, G. (2011). Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. PLoS Negl Trop Dis 5, e1155.
- Lima, A.P.C. Reis, F.G.C. e Costa, T.R.F. (2013). Cysteine peptidase inhibitors in trypanosomatid parasites. Current medicinal chemistry 20, 3152-3173.
- Lindoso, J.A., Cota, G.F., da Cruz, A.M., Goto, H., Maia-Elkhoury, A.N.S., Romero, G.A.S., de Sousa-Gomes, M.L., Santos-Oliveira, J.R. e Rabello, A. (2014). Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in Latin America. PLoS Negl Trop Dis 8, e3136.
- Marcili, A., Sperança, M.A., da Costa, A.P., Madeira, M.F., Soares, H.S., Sanches, C.O.C.C., Acosta, I.C.L., Girotto, A., Minervino, A.H.H., Horta, M.C., Shaw, J.J. e Gennari, S.M. (2014). Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in South America. Infection, Genetics and Evolution 25, 44-51.
- Matoussi N., Ameur, H.B., Amor S.B., Fitouri Z., Becher S.B. (2007). Cardiotoxicity of n-methyl-glucamine antimoniate (glucantime). A case report. Med Mal Infect 37, S257-9.
- Mauricio, I.L., Howard, M.K., Stothard, J.R., Miles, M.A. (1999) Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. Parasitology 119, 237–246.

- Mauricio, I.L., Stothard, J.R., Miles, M.A. (2000) The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16, 188–189.
- McCall, L.I., Zhang, W.W. e Matlashewski, G. (2013). Determinantes for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. *PLoS Pathog* 9, e1003053.
- Monzote, L. (2009) Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. *The Open Antimicrobial Agents Journal* 1, 9-19.
- Morrison, L.S., Goundry, A., Faria, M.S., Tetley, L., Eschenlauer, S.C., Westrop, G.D., Dostalova, A., Volf, P., Coombs, G.H., Lima, A.P.C.A. e Mottram, J.C. (2012). Ecotin-like serine peptidase inhibitor ISP1 of *Leishmania major* plays a role in flagellar pocket dynamics and promastigote differentiation. *Cellular Microbiology* 14, 1271-1286.
- Mosser, D.M. e Edelson, P.J. (1985) The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J Immunol* 135, 2785-2789.
- Nakamura, H., Yoshimura, K., McElvaney, N.G., Crystal, R.G. (1992). Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J Clin Invest* 89, 1478-1484.
- Ordóñez-Gutiérrez, L., Espada-Fernández, R., Dea-Ayuela, M.A., Torrado, J.J., Bolás-Fernández, F. e Alunda, J.M. (2007). In vitro effect of new formulations of Amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. *Int J Antimicrob Agents* 30, 325-329.
- Ouellette M., Légaré D., Haimeur A., Grondin K., Roy G., Brochu C. e Papadopolou B. (1998). ABC transporters in *Leishmania* and their role in drug resistance. *Drug Resist Update* 1, 43-48.
- PAHO/WHO – Pan American Health Organization (2015) Informe Epidemiológico das Américas. Informe Leishmanioses N°3. Disponível em: <http://www.paho.org>. Acesso em 23/05/16.
- Paris, C., Loiseau, P.M., Bories, C. e Breard, J. (2004). Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 852–859.
- Peacock, C.S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J.C., Quail, M.A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M.A., Carver, T., Norbertczak, Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Ormond, D., Rutter, S., Squares, R., Whitehead, S., Rabbinowitsch, E., Arrowsmith, C., White, B., Thurston, S., Bringaud, F., Baldauf, S., Faulconbridge, A., Jeffares, D., Depledge, D.P., Oyola, S.O., Hilley, J.D., Brito, L.O., Tosi, L.R.O., Barrell, B., Cruz, A.K., Mottram, J.C., Smith, D.F. e Berriman, M. (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 39, 839-847.
- Pham, C.T.N. (2010). Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1317-1333.
- Pimenta, P.F., Turco, S.J., McConville, M., Lawyer, P., Perkins, P., Sacks, D.L. (1992). Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sand fly midgut. *Science* 256, 1812-5.
- Proudfoot, L., Nikolaev, A.V., Feng, G-J., Wei, X.Q., Ferguson, M.A.J., Brimacombe, J.S. e 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* 93, 10984–10989.
- RAJr, G., Magill, A.J., Oster, C.N., Franke, E.D., Grogl, M., Berman, J.D. (1994). Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 18, 83-90.

- Ramalho-Ortigao, J.M., Kamhawi, S., Rowton, E.D., Ribeiro, J.M.C. e Valenzuela, J.G. (2003). Cloning and characterization of trypsin- and chymotrypsin-like proteases from the midgut of the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*. *Insect Biochem Mol Biol* 33, 163– 171.
- Rath, S., Trivelin, L.A., Imbrunito, T.R., Tomazela, D.M., de Jesús, M.N. e Marzal, P.C. (2003). Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: Estado da Arte. *Quim Nova* 26, 550-555.
- Rawlings, N.D. e Barret, A.J. (1994). Families of Serine Peptidases. *Methods In Enzimology* 244, 19-61.
- Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J. e Bateman, A. (2014). *MEROPS*: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research* 42, D503-D509.
- Rey, L. (2008). *Leishmania e Leishmanioses*: Os Parasitos. In *Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nos Trópicos Ocidentais*, eds 4ª (Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 359-371.
- Sacks, D.L., Pimenta, F.P., McConville, M.J., Schneider, P., Turco, S.J. (1995). Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sandfly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surfasse lipophosphoglycan. *J Exp Med* 181, 685-95.
- Sajid, M. e McKerrow, J.H. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular & Biochemical Parasitology* 120, 1-21.
- Sarkar, A., Ghosh, S., Pakrashi, S., Roy, D., Sen, S. e Chartterjee, M. (2012). *Leishmania* strains causing self-healing cutaneous leishmaniasis have greater susceptibility towards oxidative stress. *Free Radic Res* 46: 665–673.
- Seemüller, E., Lupas, A., Stock, D. e Lowe, J. (1995). Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* 268, 579.
- Scott, P. (1985). Impaired macrophage leishmanicidal activity at cutaneous temperature. *Parasite Immunol* 7, 277–288.
- Soto, J., Arana, B.A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J.C., Diaz, A., Luz, M., Gutierrez, P., Arboleda, M., Berman, J.D., Junge, K., Engel, J. e Sindermann, H. (2004). Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* 38, 1266-72.
- Stanley, A.C. e Engwerda, C. (2007). Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunology and Cell Biology* 85, 138-147.
- Sundar, S., Singh, A., Rai, Madhukar, R., Prajapati, V.K., Singh, A.K., Ostyn, B., Boelaert, M., Dujardin, J-C. e Chakravarty. (2012). Efficacy of Miltefosine in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in India After a Decade of Use. *Clinical Infectious Diseases* 55, 543-50.
- Wadhone, P., Maiti, M., Agarwal, R., Kamat, V., Martin, S. e Saha, B. (2009). Miltefosine promotes IFN-gamma-dominated anti-leishmanial immune response. *J Immunol* 182, 7146–7154.
- Wittner, M., Tanowitz, H.B. (2000). Leishmaniasis in infants and children. *Semin Pediatr Infect Dis* 11, 196–201.
- WHO – World Health Organization (2015). Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> Acesso em 20/05/2016.
- Young, R.E., Thompson, R.D., Larbi, K.Y., La, M., Roberts C.E., Shapiro, S.D., Perretti, M., Nourshargh, S. (2004). Neutrophil elastase (NE)-deficient mice demonstrate a nonredundant role for NE in neutrophil migration, generation of proinflammatory mediators, and phagocytosis in response to zymosan particles in vivo. *Journal of Immunology* 172, 4493–4502.

Zaghloul, I.Y. e Al-Jasser, M. (2004). Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of antimony in hamsters. *Ann Trop Med Parasitol* 98, 793-800.

Zhao, C., Papadopoulou, B. e Tremblay, M.J. (2016). *Leishmania infantum* Promotes Replication of HIV Type 1 in Human Lymphoid Tissue Cultured Ex Vivo by Inducing Secretions of the Proinflammatory Cytokines TNF- α e IL-1 α . *The Journal of Immunology* 172, 3086-3093.