

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

**Lipofosfoglicanos (LPGs) de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* na ativação  
de macrófagos murinos e vias de sinalização celular**

por

Izabela Coimbra Ibraim

Belo Horizonte

Fevereiro/2012

**DISSERTAÇÃO MBCM – CPqRR I.C.IBRAIM 2012**

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

**Lipofosfoglicanos (LPGs) de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* na ativação de macrófagos murinos e vias de sinalização celular**

por

**Izabela Coimbra Ibraim**

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

Orientação: Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares

Belo Horizonte  
Fevereiro/2012

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

I141 Ibraim, Izabela Coimbra.  
2012

Lipofosfoglicanos (LPGs) de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* na ativação de macrófagos murinos e vias de sinalização celular / Izabela Coimbra Ibraim. – Belo Horizonte, 2012.

XV, 59 f.: il.; 210 x 297mm.  
Bibliografia: f.: 66 – 74

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

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

CDD – 22. ed. – 616.936 4

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

**Lipofosfoglicanos (LPGs) de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* na ativação de macrófagos murinos e vias de sinalização celular**

por

**Izabela Coimbra Ibraim**

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares (presidente)

Dr. Marco Antônio Silva Campos

Dr. Alexandre Barbosa Reis

Suplente: Dra. Blima Fux

**Dissertação defendida e aprovada em: 08/02/2012**

*Dedico esta conquista àqueles que são o alicerce da  
minha vida:*

*A Deus, pela graça e força*

*À minha preciosa família, Joseph, Cida, Jolie, Junior e  
Tote*

*Aos amigos maravilhosos que me ensinaram tanto*

## **Colaboradores**

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

Laboratório de Imunopatologia/CPqRR

Ms. Rafael Ramiro de Assis

### **Universidade Federal de Minas Gerais**

Dra. Maria Norma Melo

### **Suporte Financeiro**

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

TDR-WHO (ID A50880)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ

## Agradecimentos

A Deus, que está sempre presente em minha vida, iluminando e guiando meus caminhos, pelos obstáculos superados e pelas bênçãos recebidas.

Aos meus pais, Joseph e Cida, e aos meus irmãos, Lucas, Nathália e Tote, por todo amor, apoio, incentivo. Obrigada por sempre acreditarem que eu seria capaz!

Ao Ms. Rafael Ramiro de Assis por me ajudar no planejamento, desenvolvimento e execução de todos meus experimentos. Eu aprendi muito com você, coisas úteis e coisas inúteis, nunca vou esquecer tudo que fez por mim. By the way, you were the best thing that happened to me!

A grande amiga com quem tive o prazer de conviver durante todo esse trabalho, Paula Monalisa *Mocréia* Nogueira, que muito me ajudou nos meus experimentos e também nas minhas crises.

Ao meu orientador Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares pela amizade, orientação, apoio e pelo crescimento profissional. Obrigada por tudo!

A minha amiga Flávia Carolina, que tem me acompanhado desde a graduação. Muito obrigada pelo seu companheirismo e pelas mensagens durante a madrugada!

A Dra. Norma Maria Melo por acolher a todo grupo e permitir que terminássemos nossos projetos em seu laboratório. Palavras não podem expressar o quanto sou grata por toda sua ajuda. Muito obrigada!

A todos os amiguinhos de laboratório e companheiros de buteco: Paula, Carol, Vanessa, Alessandra, Junara, Soraia, Priscila, Rubens, Greg, Flávia e Nino. Todos moram no meu coração! E vou sentir muito a falta de todos!

Agradecimento especial a todas as pessoas que contribuíram com reagentes, aparelhos, apoio técnico e material de laboratório nos laboratórios da UFMG e CPqRR. Realmente, nunca teria terminado esse trabalho sem a ajuda de vocês. Obrigada!

Ao Dr. Luciano Moreira e Ms. Sabrina pela oportunidade.

Aos grandes amigos que fiz no Laboratório de Malária.

Aos meus amiguinhos da pós. Valeu demais por tudo!

Ao Centro de Pesquisas René Rachou pelo suporte oferecido por meio de diferentes setores e profissionais da instituição.

Agradeço, também, a CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

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

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, cujos nomes não foram citados, mas sabem da sua importância para que este dia chegasse

Muito obrigada a todos!



## Sumário

Lista de figuras .....	XI
Lista de abreviaturas e símbolos .....	XII
Resumo .....	XIV
Abstract .....	XV
1 Introdução .....	16
2 Objetivo .....	18
2.1 Objetivo geral .....	18
2.2 Objetivos específicos .....	18
3 Revisão de literatura .....	19
3.1 As Leishmanioses .....	19
3.2 Ciclo biológico .....	20
3.3 Aspectos imunológicos das Leishmanioses .....	22
3.4 O compartimento imune inato .....	23
3.5 O compartimento imune inato e <i>Leishmania</i> .....	26
3.6 Glicobiologia de <i>Leishmania</i> .....	28
4 Metodologia .....	31
4.1 Cepas de <i>L. infantum</i> e <i>L. braziliensis</i> e condições de cultivo .....	31
4.2 Extração de LPG .....	31
4.3 Purificação e dosagem do LPG .....	32
4.4 Obtenção de células .....	32
4.5 Curva dose resposta utilizando células Raw .....	33
4.6 Curva dose resposta utilizando macrófagos BALB/c .....	33
4.7 Avaliação da produção de NO e citocinas após estimulação por LPG .....	34
4.8 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo (CBA multiplex) .....	34
4.9 Inibição da produção de NO em macrófagos estimulados com LPS .....	34

4.10	<i>Preparação dos lisados celulares e western-blot das MAPKs</i>	35
4.11	<i>Análise estatística</i>	35
5	<b>Resultados</b>	36
5.1	<i>Curva de crescimento de crescimento de promastigotas de L. infantum (MHOM/BR/70/BH46) e L. braziliensis (MHOM/BR/1975/2903)</i>	36
5.2	<i>Produção de NO – Curva de produção</i>	37
5.3	<i>Produção de NO</i>	39
5.4	<i>Produção de citocinas</i>	41
5.5	<i>Inibição da produção de nitrito pelo LPG em células peritoneais estimuladas com LPS</i>	44
5.6	<i>Modulação da ativação de MAPK</i>	45
6	<b>Discussão</b>	46
7	<b>Conclusões</b>	52
8	<b>Publicações em colaboração durante o mestrado</b>	53
9	<b>Anexos</b>	54
9.1	<i>Artigo submetido à publicação</i>	54
10	<b>Referências Bibliográficas</b>	66

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Representação do ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp. ....	21
<b>Figura 2:</b> Vias de sinalização dos receptores do tipo Toll .....	25
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática dos glicoconjugados de <i>Leishmania</i> .....	28
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática da estrutura do LPG .....	29
<b>Figura 5:</b> Diagrama esquemático da estrutura do LPG .....	30
<b>Figura 6:</b> Curva de crescimento de promastigotas <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> .....	36
<b>Figura 7:</b> Indução da produção de nitrito em macrófagos de linhagem contínua Raw 264.7 .....	38
<b>Figura 8:</b> Indução da produção de nitrito em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c .....	39
<b>Figura 9:</b> Indução da produção de nitrito .....	40
<b>Figura 10:</b> Indução da produção de TNF- $\alpha$ .....	41
<b>Figura 11:</b> Indução da produção das citocinas IL-10 (A) e IL-12 (B) .....	42
<b>Figura 12:</b> Indução da produção das citocinas IL-1 $\beta$ (A) e IL-6 (B) .....	43
<b>Figura 13:</b> Inibição da produção de nitrito pelo LPG em macrófagos posteriormente estimulados com LPS .....	44
<b>Figura 14:</b> Cinética de ativação das MAPKs (ERK e p38) pelo LPG de (A), <i>L. infantum</i> e (B), <i>L. braziliensis</i> .....	45

## Lista de abreviaturas e símbolos

AP-1 – Proteína ativadora 1

BH46 – *Leishmania infantum* (MHOM/BR/70/BH46)

CD – “cluster” de diferenciação

CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ERK – Cinasas reguladas por sinal extracelular

ESOAK – Água/etanol/etil éter/piridina/NH<sub>4</sub>OH; 15:15:5:1:0,017

Gal – Galactose

GalNAc – N-acetil galactosamina

GIPLs – Glicoinositolfosfolípidos

Glc – Glicose

GlcN – Glicosamina

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

Hex – Hexose

IFN- $\gamma$  – Interferon gama

IL – Interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

JNK – c-Jun amino-terminal cinases (c-Jun N-terminal kinases)

LC – Leishmaniose cutânea (LC)

Linfócitos Th1 – Linfócitos T auxiliares do tipo 1

Linfócitos Th2 – Linfócitos T auxiliares do tipo 2

LCM – Leishmaniose cutâneo-mucosa

LPG – Lipofosfoglicano

LPS – Lipopolissacarídeo

LV – Leishmaniose visceral

Man – Manose

MAPKs – Proteínas cinases ativadas por mitógenos

MyD88 – *Myeloid differentiation primary response gene 88*

NaF – Fluoreto de sódio

NF- $\kappa$ B – Fator nuclear kappa B

NK – células citotóxicas naturais (Natural Killer)

NO – Óxido nítrico

PAMPs – Padrão molecular associado à patógeno

PG – Fosfoglicano

PI – Fosfatidilinositol

PP75 – *Leishmania infantum* (MHOM/BR/74/PP75)

PPGs – Proteofosfoglicanos

PRR – Receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern recognition receptors*)

PSPs ou gp63 – Proteases da superfície de promastigotas

RPMI – Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura)

sAP – Fosfatases ácida secretadas.

SDS PAGE – Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida

STAT – Moléculas de transdução de sinal e ativadores de transcrição

TLR – Receptores do tipo Toll (*Toll-like receptor*)

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

TRAF6 – Receptor de TNF associado ao fator 6 (*TNF receptor associated factor 6*)

WHO/OMS – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

## Resumo

O LPG apresenta variações estruturais que são importantes para os diferentes estágios de desenvolvimento do parasito. Nas formas procíclicas, o LPG de *L. braziliensis* (cepa M2903), não apresenta cadeias laterais enquanto um a dois resíduos de  $\beta$ -glicose podem aparecer nas unidades repetitivas da forma metacíclica. O LPG de *L. infantum* (cepa BH46), apresenta até três cadeias laterais de glicoses nas unidades repetitivas da forma procíclica e ainda não foi caracterizado nas formas metacíclicas. Esses polimorfismos nas unidades repetitivas do LPG e seu papel na interação com o hospedeiro vertebrado e invertebrado já foram amplamente estudados, sobretudo, para as espécies do Velho Mundo. Entretanto, para a maioria das espécies do Novo Mundo, o papel desses polimorfismos no perfil imunopatológico da doença é ainda desconhecido. Este projeto teve como objetivo avaliar o estudo da interação entre os LPGs de duas espécies epidemiologicamente importantes no Brasil e macrófagos murinos. Estas incluem *L. braziliensis* e *L. infantum*, responsáveis pela forma cutânea e visceral, respectivamente.

Neste estudo, os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, C57BL/6 e C57BL/6 knock-out (TLR2 -/- e TLR4 -/-), foram primados com IFN- $\gamma$  e estimulados com LPG de ambas as espécies. A produção de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-2; IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) foi determinada por citometria de fluxo e a concentração de nitrito pelo método de Griess. A ativação de ERK e p38 foi avaliada por Western blot. Os macrófagos estimulados com LPG de *L. braziliensis*, apresentaram uma maior produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e NO em comparação aos estimulados com LPG de *L. infantum*. Também foi observada uma cinética de ativação diferencial das MAPK entre os LPGs. *Leishmania infantum* apresentou uma ativação constante até 45 minutos após estimulação, enquanto *L. braziliensis* apresentou um único pico de ativação após 15 minutos. Estes dados sugerem que variações interespecíficas no LPG de *Leishmania* podem ter um papel importante nos eventos iniciais do compartimento imune inato do hospedeiro.

## Abstract

The structural variations observed on LPG are important for the different parasite developmental stages. The procyclic form of *L. braziliensis* LPG (strain M2903), is devoid of side chains, while one to two  $\beta$ -glucose side chains are added in the repeat units of the metacyclic LPG. The *L. infantum* LPG has with up to 3 glucoses residues in the repeat units in the procyclic parasites, while those structures are not known in the metacyclic stage. Those polymorphisms in the composition and sequence of the sugars branching off the repeat units of the LPG have been assessed in the interaction with vertebrate and invertebrate hosts, especially for the Old World *Leishmania* species. However, for most of New World species of *Leishmania*, the role of those polymorphisms in the immunopathology of the disease is still unknown. This study aimed to evaluate the interaction between the LPGs of two epidemiologically important Brazilian species and murine macrophages. Those include *L. braziliensis* and *L. infantum*, causative agents of cutaneous and visceral leishmaniasis, respectively.

Mice peritoneal macrophages from BALB/c, C57BL/6, and C57BL/6 knock-out (TLR2 -/- e TLR4 -/-) lineages were primed with IFN- $\gamma$  and stimulated with LPG from both species. Cytokine production (IL-1 $\beta$ , IL-2; IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) and nitrite concentration were determined by flow cytometry and Griess reaction, respectively. Western blot was performed to evaluate the activation of the MAPKs ERK and p38. Macrophages stimulated with *L. braziliensis* LPG, had a higher TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e NO production than those stimulated with *L. infantum*'s. A different MAPK activation kinetics between the two species was detected. *Leishmania infantum* LPG exhibited a gradual activation profile until 45 min after stimulation, whereas *L. braziliensis* LPG showed an activation peak at 15 min. These data suggest that interpecies variations in *Leishmania* LPG may have an important role during initial steps of infection in the host's innate immune system.

## 1 Introdução

As Leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo responsável por um espectro de manifestações clínicas incluindo formas cutâneas (LC), cutâneo-mucosa (LCM) e visceral (LV). No Brasil, a LCM e a LV são causadas pelas espécies *L. braziliensis* e *L. infantum*, respectivamente. As leishmanioses são doenças negligenciadas frequentemente relacionadas à pobreza e conflitos sociais. Possuem ampla distribuição mundial e estima-se que 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco tanto no Novo quanto no Velho Mundo. Embora essencialmente rurais, as leishmanioses se encontram em franca expansão atingindo os grandes centros urbanos. As dificuldades no controle de reservatórios e vetores, a ineficácia dos tratamentos devido a cepas resistentes e a inexistência de vacinas humanas são alguns dos fatores que contribuem para sua expansão.

Estudos que auxiliem a compreensão dos mecanismos de interação de *Leishmania* com seus hospedeiros constituem uma ferramenta importante no entendimento da biologia deste parasito. Desta forma, a variabilidade genética em *Leishmania* tem sido alvo de um grande número de estudos que buscam identificar marcadores de virulência e correlacioná-los com a imunopatologia da doença. Um fator de virulência importante, o lipofosfoglicano (LPG), é o glicoconjugado majoritário da superfície de *Leishmania*. Durante o processo de interação parasito-hospedeiro, esta molécula desempenha um papel crucial na sobrevivência do parasito. Ele está envolvido no estabelecimento da infecção em macrófagos, na manipulação das vias de sinalização, na modulação da produção de citocinas e óxido nítrico, na proteção contra destruição pelo complemento, dentre outras. Estudos prévios de nosso grupo demonstraram que as estruturas dos LPGs de *L. infantum* e *L. braziliensis* apresentam diferenças importantes quanto à presença/ausência de resíduos de glicose nas unidades repetitivas.

Nas formas procíclicas de *L. braziliensis*, o LPG não apresenta cadeias laterais em suas unidades repetitivas, enquanto podem ser observados de um a dois resíduos de  $\beta$ -glicose na forma metacíclica. O LPG de *L. infantum*, ainda não completamente caracterizado na forma metacíclica, apresenta cadeias laterais com até três glicoses nas unidades repetitivas das formas procíclicas (Figura 5). Esses polimorfismos nas unidades repetitivas do LPG e seu papel na interação com os hospedeiros vertebrado e invertebrado já foram amplamente estudados nas espécies de *Leishmania* do Velho Mundo. Entretanto, para as espécies do Novo Mundo, não se sabe o real papel desses polimorfismos, e se essas diferenças, na estrutura e distribuição do LPG, são apenas importantes nos diferentes estágios de desenvolvimento da *Leishmania* ou podem também refletir o perfil imunopatológico da doença.



Como parte de um amplo projeto que tem como objetivo o estudo da Glicobiologia de espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, este trabalho avaliou a interação entre macrófagos e LPGs de *L. braziliensis* e *L. infantum*, espécies responsáveis pelas formas cutânea e visceral, respectivamente.

## **2 Objetivo**

### ***2.1 Objetivo geral***

Avaliar alguns aspectos da imunidade inata na interação entre os LPGs de *L. braziliensis* e *L. infantum* e macrófagos murinos.

### ***2.2 Objetivos específicos***

Avaliar a produção diferencial de óxido nítrico e citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-2; IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) em macrófagos murinos de diferentes linhagens estimulados por LPGs das duas espécies.

Avaliar as MAP cinases ERK1/2 e SAPK-2/p38 em macrófagos murinos de camundongos BALB/c após estimulação com LPGs das duas espécies.

Avaliar se receptores do tipo toll 2 e 4 são reconhecidos por LPGs das duas espécies

### 3 Revisão de literatura

#### 3.1 As Leishmanioses

As leishmanioses são causadas por protozoários da família Trypanosomatidae (ordem: Kinetoplastida) do gênero *Leishmania*. Elas são doenças negligenciadas, estando em 6º lugar segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2010). Estima-se que 14 milhões de pessoas estejam infectadas. A cada ano, a incidência de novos casos para a LV é de cerca de 500 mil, enquanto que para LC este número possa chegar a 1,5 milhão de casos. Entretanto, estes números podem estar subestimados, uma vez que as leishmanioses são obrigatoriamente notificadas somente em 33 dos 88 países onde elas ocorrem. Cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas risco no Novo e no Velho Mundo (Desjeux, 2004).

Os parasitos do gênero *Leishmania* infectam vários mamíferos silvestres ou domésticos. No homem, as leishmanioses são causadas por aproximadamente 21 espécies sendo transmitidas no Novo e Velho Mundo por flebotomos dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (Psychodidae, Phlebotominae), respectivamente (Herwaldt, 1999). Até o momento, aproximadamente 1000 espécies de flebotomíneos já foram descritas, e dessas, 30 são vetores comprovados ou suspeitos na transmissão do parasito (Desjeux, 2004).

As leishmanioses englobam um espectro de manifestações clínicas dependendo da espécie, região, estado imunológico e genético do indivíduo (Carvalho *et al.*, 2005). Elas são classificadas em leishmaniose cutânea (LC), cutâneo-mucosa (LCM) e visceral (LV) (Cunningham, 2002). A LC no Velho Mundo é causada por *L. infantum*, *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica* e *Leishmania donovani*. No Novo Mundo, esta forma é causada por espécies dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. As primeiras incluem *Leishmania (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) venezuelensis* e *L. (L.) garnhami*. As espécies do subgênero *Viannia* são *L. (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) peruviana*, *Leishmania (V.) lainsoni* e *Leishmania (V.) colombiensis* (Reithinger *et al.*, 2007). Neste estudo, abordaremos especificamente as espécies *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis*, causadoras de LV e LC/LCM, respectivamente.

A LV é endêmica em aproximadamente 72 países (WHO, 2010), sendo uma das formas mais graves podendo levar a óbito se não tratada. Os agentes etiológicos são *L. donovani* (Ásia e África) e *L. infantum* (Ásia, Europa, África e Américas). Nas Américas e principalmente no Brasil, a LV apresenta ampla distribuição, coincidente com a ocorrência de

seu vetor (Lainson e Rangel, 2005). Esta forma, em geral, é assintomática ou subclínica, podendo seguir curso agudo, subagudo ou crônico. Na síndrome Kalazar clássica os sinais e sintomas são febre, hepato-esplenomegalia, pancitopenia, anemia, trombocitopenia, leucopenia com neutropenia, eosinopenia, linfócitos, monocitose e hipergamaglobulinemia (Herwaldt, 1999). Os cães são os principais reservatórios domésticos, enquanto raposas e marsupiais constituem os reservatórios silvestres (Grimaldi *et al.*, 1989; Sherlock *et al.*, 1984). A LV, inicialmente rural, tem-se urbanizado como resultado da adaptação do vetor, degradação ambiental e movimentos migratórios (Barata *et al.*, 2005; Werneck, 2008). No Brasil, este vetor é a *Lutzomyia longipalpis*, que possui alta antropofilia e capacidade de se adaptar aos ambientes domésticos e peri-domésticos (Lainson e Rangel, 2005).

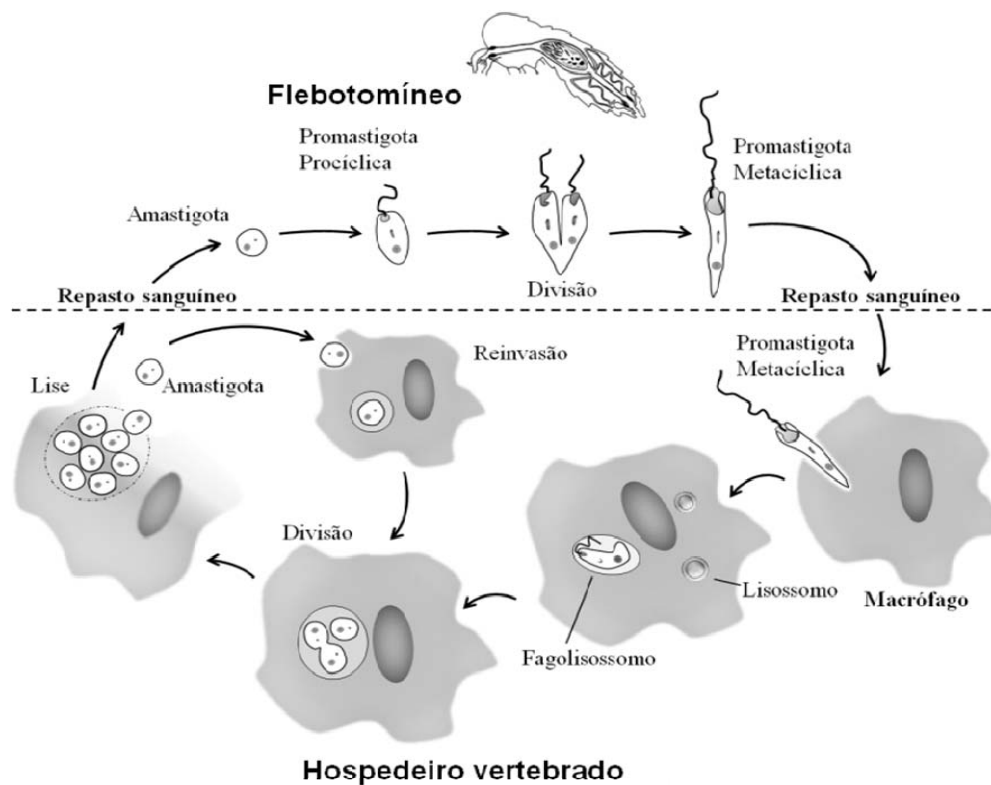
As formas tegumentares causadas por *L. braziliensis* incluem a LC e a LCM. A LC pode ocorrer em qualquer parte do corpo, mas geralmente é originada no local da inoculação. Apresenta-se como uma lesão uniforme, iniciada como uma pápula avermelhada. Posteriormente, evolui para uma úlcera com bordas bem demarcadas, podendo aparecer semanas, meses ou anos após a infecção (Herwaldt, 1999; Ashford, 2000). A LCM ocorre apenas no Novo Mundo sendo causada por *L. braziliensis* e *L. panamensis*. Casos da doença já foram observados na Bolívia, Brasil e Peru, causando intenso dano das mucosas oral, nasal, laríngea e faríngea, com conseqüentes lesões desfigurantes (Herwaldt, 1999). Curas espontâneas são incomuns para essa forma da doença e infecções bacterianas secundárias estão frequentemente associadas, sendo a causa mais comum de óbito. (WHO, 2010). No Brasil, *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia intermedia* são os principais vetores de *L. braziliensis* (Grimaldi e Tesh, 1993).

### **3.2 Ciclo biológico**

Durante seu ciclo de vida, o parasito possui dois estágios de desenvolvimento: as formas amastigotas intracelulares, que são ovóides, imóveis e sem flagelo aparente, encontrada em fagócitos mononucleares no hospedeiro vertebrado e as formas promastigotas, que são alongadas, flageladas e móveis encontradas no intestino do vetor (Kaye e Scott, 2011).

Durante o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado, a fêmea do flebotomíneo ingere macrófagos/monócitos contendo as formas amastigotas do parasito. No intestino médio, estas se diferenciam em promastigotas procíclicas que se dividem e aderem ao epitélio intestinal, evitando sua eliminação com o bolo alimentar. Após o processo de metaciclogênese, as

promastigotas se desprendem do epitélio e migram em direção ao intestino anterior se diferenciando em promastigotas metacíclicas. Em um novo repasto sanguíneo, estas formas são inoculadas no hospedeiro, sendo fagocitadas pelos macrófagos, diretamente ou após a infecção de neutrófilos (van Zandberg *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2008; Rogers *et al.*, 2009). Após a fagocitose, os parasitos são internalizados em um vacúolo e se diferenciam em formas amastigotas, sendo capazes de inibir os mecanismos microbicidas da célula (Descoteaux e Turco, 1999). Estas se multiplicam continuamente, até o rompimento do macrófago e liberação dos parasitos que poderão infectar outras células ou serem ingeridos pelo vetor (Reithinger *et al.*, 2007) (Figura 1).



**Figura 1:** Representação do ciclo de vida de *Leishmania* spp. (Adaptado de Assis *et al.*, 2012a).

Durante seu ciclo os parasitos encontram condições adversas ao seu desenvolvimento tanto no vetor quanto no hospedeiro vertebrado, desenvolvendo diversos mecanismos de escape, como por exemplo, os glicoconjugados. Estes podem estar ancorados à membrana ou serem secretados (Sacks e Kamhawi, 2001; Turco, 2003). A participação destas moléculas, especialmente os lipofosfoglicanos (LPGs), na sobrevivência do parasito no hospedeiro vertebrado será discutida mais a diante, sendo o foco principal desse trabalho.

### 3.3 Aspectos imunológicos das Leishmanioses

De uma forma geral, o controle da *Leishmania* no hospedeiro humano envolve tanto uma resposta imune inata quanto adaptativa. O balanço inicial de uma resposta celular eficiente pode direcionar para uma melhor imunidade adquirida e, conseqüentemente diminuir a gravidade dos eventos imunopatológicos (Gazzinelli *et al.*, 2004). No caso de *L. major*, é bem conhecido o perfil de resistência (Th1) e susceptibilidade (Th2) envolvendo células T auxiliares (CD4+), desenvolvido no modelo de infecção experimental de camundongos BALB/c e C57BL/6 (Sacks e Noben-Trauth, 2002).

Os macrófagos são células imunes efetoras essenciais na resposta imune contra a *Leishmania*. Dependendo do contexto e do microambiente de citocinas ao qual são expostas, essas células podem diferenciar em sub-populações distintas, refletindo as vias clássica e alternativa de ativação, que agem de forma oposta, mas com papéis imunológicos complementares (Holzmüller *et al.*, 2006). Aqueles ativados pela via clássica (tipo 1), são determinantes durante a resposta do tipo Th1. As células natural killer (NK) e Th1, em resposta a produção de IL-12, produzem Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) que atua como primeiro estímulo para a ativação dos macrófagos (Mosser e Edwards, 2008). O desenvolvimento de uma resposta imune celular capaz de controlar a infecção por *Leishmania* é criticamente dependente de IFN- $\gamma$ , o qual aumenta a resposta microbicida dos macrófagos principalmente através da indução da síntese de NO (Mosser e Edwards, 2008). Além do IFN- $\gamma$ , a IL-12 é também crucial na infecção por *Leishmania* (Watford *et al.*, 2004). Ela é um heterodímero composto de duas subunidades (p35 e p40) sendo primariamente produzida por células dendríticas e macrófagos (Trinchieri *et al.*, 2003). Além disso, o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), é outro produto importante dos monócitos/macrófagos neste processo. Esta citocina desempenha um papel central no início e na regulação da cascata de citocinas durante a resposta inflamatória, e ainda está envolvida em eventos locais e sistêmicos durante a inflamação (Makhatadze, 1998).

### 3.4 O compartimento imune inato

Durante os eventos iniciais da resposta imune inata, o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores do tipo Toll (TLR) são importantes para a indução de TNF- $\alpha$  que age de forma autócrina estimulando a célula. Assim, em resposta a presença de IFN- $\gamma$ , em combinação com TNF- $\alpha$ , essas células se tornam células efetoras com alta capacidade microbicida (Gazzinelli et al., 2004). Esses macrófagos secretam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-23 e IL-12, produzem níveis elevados de espécies reativas de oxigênio e apresentam alta expressão de óxido nítrico sintetase (iNOS) (Mosser e Edwards, 2008).

Do que foi exposto, é importante salientar que a polarização de uma resposta Th1 ou Th2 será dependente do balanço de citocinas geradas e da espécie de *Leishmania*, que nem sempre segue o padrão definido para *L. major*, principalmente em parasitos do Novo Mundo como *L. infantum* e *L. braziliensis* onde um perfil misto de resposta pode ser observado em varias formas da doença (WHO, 2010). Entretanto, um aspecto ainda desconhecido é como moléculas de superfície destas espécies podem ativar a resposta imune inata.

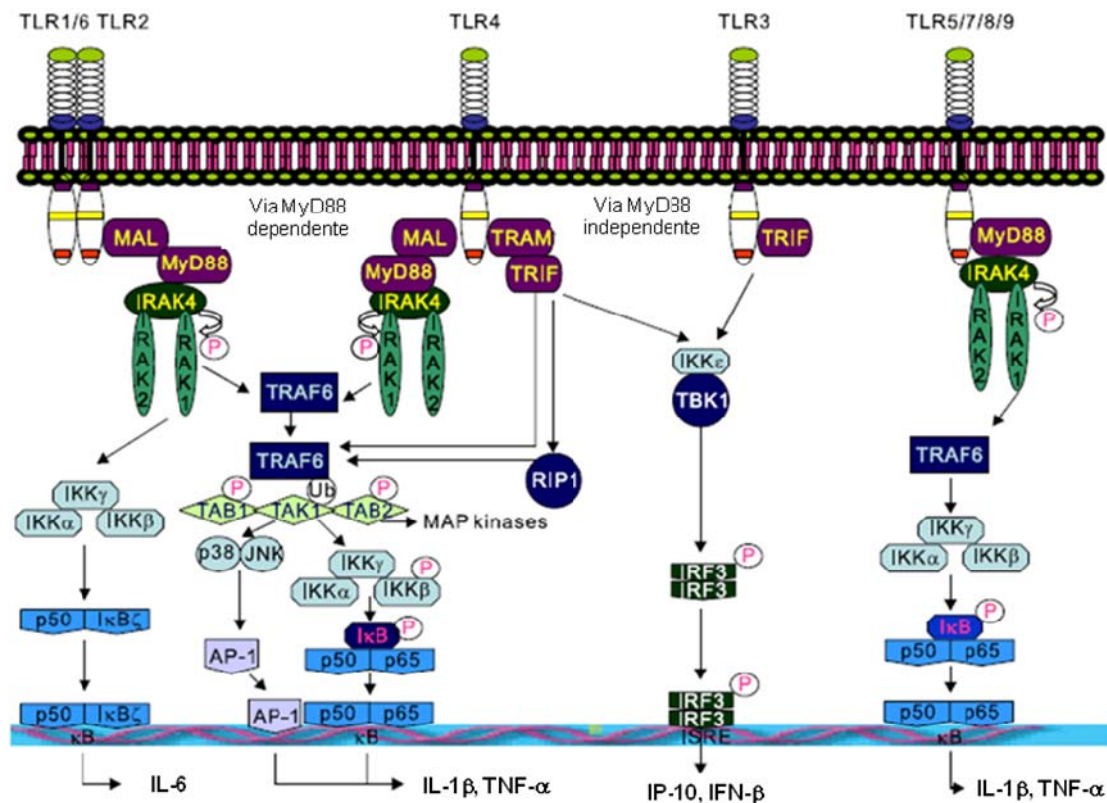
Os TLRs são expressos em células do sistema imune, como macrófagos, células dendríticas, células B e NK, sendo importantes componentes da resposta imune inata do hospedeiro (Medzhitov e Janeway, 1997; Muzio e Mantovani, 2000). Eles são proteínas transmembrana que contém vários domínios: um extracelular formado de unidades repetitivas ricas em leucina, outro citoplasmático homólogo à do receptor de IL-1, conhecido como domínio do receptor Toll/IL-1 (TIR), importante na via de sinalização (Janeway e Medzhitov, 2002).

Já são conhecidos 13 TLRs em camundongos e 11 TLRs em humanos, sendo específicos para PAMPs distintos e produzem diferentes respostas (Carpenter e O'Neill, 2007; Kawai e Akira, 2006). O primeiro TLR identificado foi o TLR4, envolvido no reconhecimento do lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias gram-negativas (Poltorak *et al.*, 1998). Subsequentemente, a especificidade de reconhecimento de outros tipos de TLRs para os diversos PAMPs foi identificada. De uma forma geral, TLR1, -2, -4, -6 e -10 reconhecem lipídeos. TLR2, em dimerização com TLR1 e TLR6, reconhecem triacil lipopeptídeos e diacil lipopeptídeos, respectivamente. Essa diversidade no reconhecimento de TLR2 é resultado da heterodimerização com TLR1 ou TLR6 e/ou moléculas acessórias, como CD14 e CD36 (Ozinsky *et al.*, 2000; Iwaki *et al.*, 2005; Hoebe *et al.*, 2005). TLR3 reconhece fitas duplas de RNA, que são produzidas por muitos vírus durante a replicação. TLR7 reconhece fragmentos

sintéticos de moléculas tipo imidazoquinolina, análogos de guanosina e fita simples de RNA. TLR8 participa do reconhecimento de imidazoquinolinas e fita simples de RNA. TLR9 reconhece motivos CpG de DNA bacteriano e viral (Miggin e O'Neill, 2006). TLR5 reconhecem flagelinas e o TLR11 humano reconhece o uropatógeno *Escherichia coli* (Zhang *et al.*, 2004). Por outro lado, o TLR11 murino reconhece uma proteína tipo-profilina, ligante de actina presente em protozoários (Yarovinsky *et al.*, 2005; Lauw *et al.*, 2005). Em relação à infecção por *Leishmania*, TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 foram identificados como receptores importantes (revisado por Tuon *et al.*, 2008) principalmente em espécies do Velho Mundo (de Veer *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2003). Entretanto, ainda não sabemos quais TLRs seriam reconhecidos pelo LPG de espécies do Novo Mundo, como *L. infantum* e *L. braziliensis*.

Após o reconhecimento dos PAMPs, ocorre a ativação de uma cascata de sinalizações intracelulares, que culmina com a indução de citocinas. Esses eventos ocorrem pela formação de complexos de proteínas entre os TLRs e os receptores proximais citoplasmáticos TIR, juntamente com moléculas adaptadoras. Em geral, as vias majoritárias ativadas por TLRs compreendem a via  $\kappa$ B(IKK), proteínas ativadas por mitógenos-MAPK e a via PI3K/Akt. Essas vias de sinalização regulam o balanço entre a viabilidade e a inflamação celular, sendo direcionadas pelo recrutamento da proteína adaptadora ao domínio intracelular dos TLRs (Akira e Takeda, 2004) (Figura 2).





**Figura 2: Vias de sinalização dos receptores do tipo Toll.** Os TLRs reconhecem padrões específicos dos componentes microbianos levando a ativação sequencial de MyD88 e TRIF. MyD88 é um adaptador essencial para a resposta inflamatória. MyD88 se liga ao domínio TIR do receptor e fosforila IRAK4, que fosforila IRAK1. IRAK1 fosforila TRAF6 levando a ubiquitinação do complexo TAK. Ativação das vias IKK (NF- $\kappa$ B), JNK e p38 leva a produção de citocinas inflamatórias (Figura adaptada de Krishnan *et al.*, 2007).

O domínio TIR pode estar ligado a cinco moléculas adaptadoras: o fator adaptador de diferenciação mielóide 88 (MyD88), MAL (adaptador MyD88-similar), TIRAP (proteína adaptadora contendo o domínio TIR), TRIF (adaptador contendo o domínio TIR induzindo Interferon- $\alpha$ ), TRAM (molécula adaptadora relacionada ao TRIF) e SARM (proteína contendo SAM e ARM) (O'Neill *et al.*, 2003). A sinalização via MyD88 é uma das mais estudadas e está envolvida na ativação de NF- $\kappa$ B por todos os TLRs, exceto TLR3. A ativação de TLRs, por um PAMP, recruta o fator adaptador MyD88 do domínio TIR (Medzhitov, 1998). Em seguida, uma série de eventos intracelulares culminando com a degradação de I $\kappa$ B, permite a translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias (Kawai e Akira, 2006). Essa via é conhecida como MyD88-dependente e seu papel já foi demonstrado em infecções bacterianas e por *Leishmania*. Camundongos deficientes em MyD88 foram ineficazes em montar uma resposta inflamatória contra LPS, peptídeoglicanos, lipoproteínas e motivos CpG (Takeuchi *et al.*, 2000; Kawai *et al.*, 1999; Hacker *et al.*, 2000; Schnare *et al.*, 2000). Em adição, esses camundongos foram

resistentes ao choque induzido por flagelinas (Hayashi *et al.*, 2001). Em *Leishmania*, a expressão de IL-1 $\alpha$  foi substancialmente diminuída em animais deficientes em MyD88 (Hawn *et al.*, 2002). Em outro trabalho, camundongos C57BL/6 se tornaram susceptíveis a infecção em consequência do aumento de IL-4 e diminuição de IFN- $\gamma$ , e IL-12p40 (Muraille *et al.*, 2003). Esses resultados demonstraram o papel destes componentes durante a resposta imune inata.

### 3.5 O compartimento imune inato e *Leishmania*

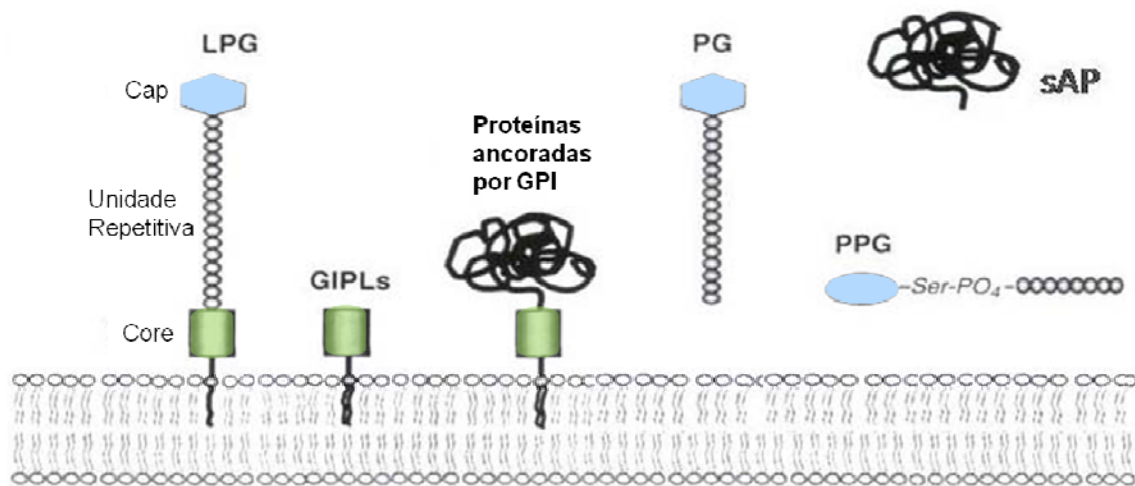
Vários estudos têm demonstraram a participação de TLR4 e TLR9 na infecção por *Leishmania* (Tuon *et al.*, 2008) e TLR2 no reconhecimento do LPG de *Leishmania* em células NK e macrófagos (Becker *et al.* 2003, de Veer *et al.*, 2003). É possível que essa interação com TLRs em macrófagos, module funções importantes garantindo a sobrevivência do parasito. O silenciamento da expressão de TLR2, TLR3, IRAK-1 e MyD88 revelou o seu envolvimento na produção de NO e TNF- $\alpha$  por macrófagos em resposta a infecção por *L. donovani* (Flandin *et al.*, 2006). Outro estudo mostrou que camundongos TLR4 (-/-) tiveram menor resistência a infecção por *L. major* (Kropf *et al.*, 2004). Em infecções por *L. donovani*, foi demonstrado que o parasito inibiu a produção de IL-12p40 via TLR2 e TLR4 em macrófagos. Isto também resultou num aumento da produção de IL-10 através da supressão da fosforilação de p38 e ativação de ERK (Chandra e Naik, 2008). Porém, muitos destes mecanismos ainda são desconhecidos em espécies do Novo Mundo. Trabalhos recentes com *L. braziliensis* demonstraram que apesar da importância de MyD88 no reconhecimento *in vitro* e *in vivo* do parasito, o TLR2 apresentou um papel modulatório nas respostas imunes em células dendríticas (Vargas-Inchaustegui *et al.*, 2009).

As múltiplas vias de sinalização das MAPK estão presentes em todas as células dos eucariotos. Essas vias regulam de forma coordenada diversas atividades celulares, como expressão gênica, mitose, metabolismo e motilidade, sobrevivência, apoptose e diferenciação celular. Até hoje, cinco grupos distintos de MAPKs foram caracterizados em mamíferos: cinases reguladas por sinal extracelular (ERKs) 1 e 2 (ERK1/2), c-Jun amino-terminal cinases (JNKs) 1, 2, e 3, p38 isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$ , ERKs 3 e 4, e ERK5 (revisado por Kyriakis e Avruch, 2001; Chen *et al.*, 2001). O grupo das MAP cinases mais estudados nos vertebrados são as cinases ERK, JNK, p38. As MAPKs podem ser ativadas por uma variedade de estímulos. Em geral, ERK-1 e ERK-2 são preferencialmente ativadas em resposta fatores de crescimento, enquanto JNK e p38 são mais responsivas ao estresse celular (choque osmótico a

radiação ionizante) e estimulação por citocinas (Pearson *et al.*, 2001). A inibição das MAPKs em infecções por *Leishmania* foi inicialmente descrita em amastigotas de *L. amazonensis*, demonstrando uma rápida alteração na fosforilacao de ERK em resposta a LPS (Martiny *et al.*, 1999). Em um segundo trabalho utilizando amastigotas de *L. donovani* foi demonstrado que a inativação de ERK foi acompanhada pela inibição do fator transcricional Elk-1 e inibição da expressão de c-fos (Nandan *et al.*, 1999). Estudos utilizando promastigotas e fosfoglicanos (PGs) sintéticos de *Leishmania* demonstraram que estas moléculas são capazes de interferir na produção de IL-12 e de NO em macrófagos pela via da cinase ERK (Feng *et al.*, 1999). Em relação à p38, células infectadas por *L. major* modularam negativamente a produção de NO por esta via (Awasthi *et al.*, 2003). Inúmeros outros trabalhos têm demonstrado que as MAPKs têm sua ativação inibida em macrófagos infectados com *Leishmania*, onde a inibição de suas fosforilações resulta em baixa expressão de IL-12 e iNOS (Ajizian *et al.*, 1999; Salmon *et al.*, 2001). Mais recentemente, Balaraman *et al.* (2005) demonstraram que o LPG de *L. donovani* estimula a ativação simultânea das cinases ERKs, JNK e p38, em células J774; contudo, com cinética diferenciada. ERK e p38 são aparentemente necessárias para a ativação de AP-1, produção de IL-12 e indução de NO nestas células. Entretanto, o papel dos LPGs de espécies do Novo Mundo nestas vias ainda são desconhecidos.

### 3.6 Glicobiologia de *Leishmania*

Durante os fenômenos de interação anteriormente descritos, o papel dos glicoconjugados de *Leishmania* é crucial para a sobrevivência contra condições extremamente adversas em seu ciclo de vida (Assis *et al.*, 2012b). Estes são determinantes na interação com o hospedeiro vertebrado e invertebrado, uma vez que mutantes para estas moléculas não são capazes de sobreviver em seus respectivos hospedeiros (Butcher *et al.*, 1996). Os glicoconjugados de superfície incluem o lipofosfoglicano, os glicosilfosfolípides (GIPLs) e as proteases de superfície (GP63) que são ancorados por glicosilfosfatidilinositol (GPI). Além disso, os glicoconjugados podem ser secretados sob a forma de fosfatases ácidas (SAP), fosfoglicanos (PGs) e proteofosfoglicanos (PPGs) (Turco, 2003) (Figura 3).

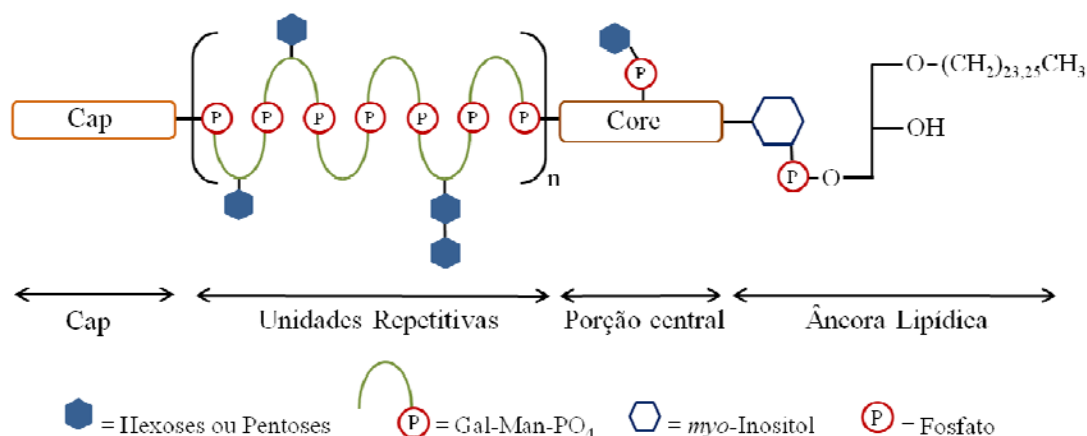


**Figura 3: Representação esquemática dos glicoconjugados de *Leishmania*.** LPG = lipofosfoglicano, GIPLs = glicosilinositolfosfolípide, GPI=glicosilfosfatidilinositol, PG = fosfoglicano, PPG = proteofosfoglicano, SAP = fosfatase ácida secretada. (Adaptada de Turco, 2003).

Dentre os glicoconjugados de *Leishmania*, os LPGs são os mais estudados, sendo expressos predominantemente nas formas promastigotas e ausentes nas formas amastigotas (McConville e Blackwell, 1991). O LPG é um fator de virulência multifuncional tendo importância na interação com os hospedeiros vertebrado e invertebrado. Suas principais funções incluem: adesão e especificidade ao intestino médio do inseto vetor e resistência a ação de enzimas digestivas (revisado por Sacks & Kamhawi, 2001), resistência à destruição pelo complemento (Brittingham e Mosser, 1996), inibição do processo de maturação do fagossomo (Dermine *et al.*, 2000), modulação da produção de IL-1, IL-1 $\beta$ , IL-12 e NO (Frankenburg *et al.*, 1990; Hatzigeorgiou *et al.*, 1996; Proudfoot *et al.*, 1996; Piedrafita *et al.*,

1999), inibição da proteína cinase C- PKC (Giorgione e Turco, 1996), agonista de TLR2 (Becker *et al.* 2003, de Veer *et al.*, 2003), indução de redes extracelulares de neutrófilos (Guimarães-Costa *et al.*, 2009) e indução de PKR (Vivarini *et al.*, 2011).

O LPG forma um glicocálice denso, recobrendo toda superfície do parasito incluindo o flagelo (Turco e Descoteaux, 1992), sendo estruturalmente composto por 4 domínios: (I), uma âncora de 1-*O*-alquil-2-*liso*-fosfatidilinositol (PI); (II), uma porção central composta por um heptassacarídeo Gal( $\alpha$ 1-6)Gal( $\alpha$ 1-3)Gal<sub>n</sub>( $\beta$ 1-3)[Glc( $\alpha$ 1)-PO<sub>4</sub>]Man( $\alpha$ 1,3)Man ( $\alpha$ 1,4)-GlcN( $\alpha$ 1); (III), uma região de repetições de dissacarídeos fosforilados Gal( $\beta$ 1,4)Man ( $\alpha$ 1)- PO<sub>4</sub> e (IV), um oligossacarídeo neutro terminal do tipo “cap” (Descoteaux e Turco, 1999) (Figura 4).

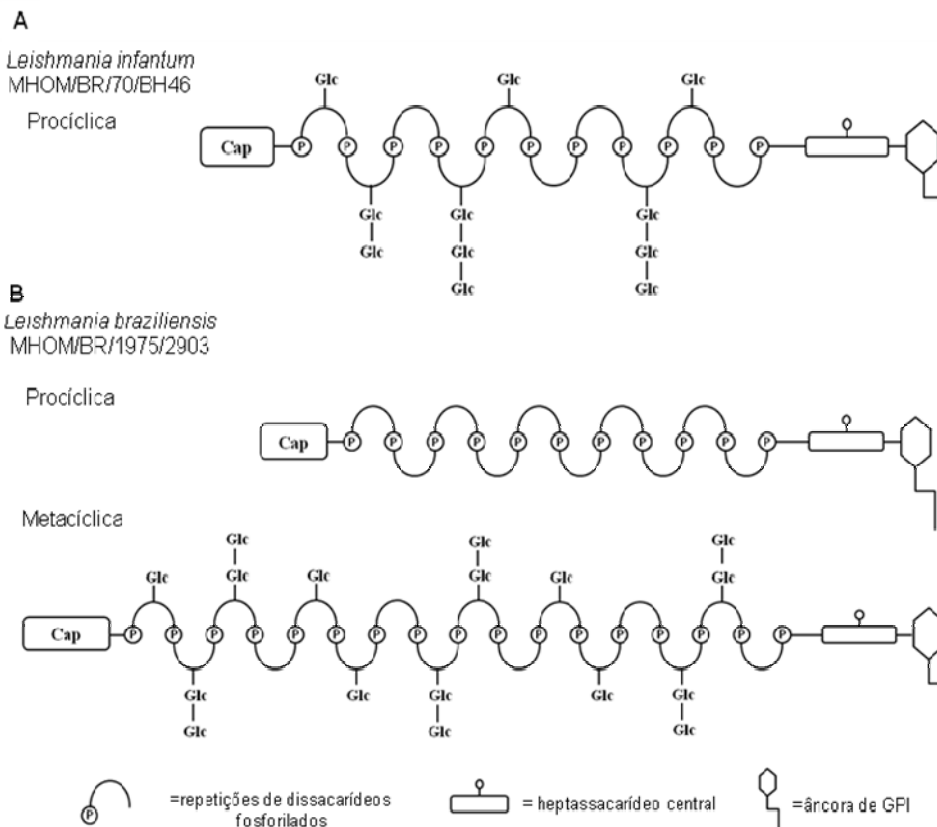


**Figura 4: Representação esquemática da estrutura do LPG.** Bioquimicamente é composto por 4 domínios: I) uma âncora de 1-*O*-alquil-2-*liso*-fosfatidilinositol (PI), (II) uma porção central composta por um heptassacarídeo Gal( $\alpha$ 1-6)Gal( $\alpha$ 1-3)Gal<sub>n</sub>( $\beta$ 1-3)[Glc( $\alpha$ 1)-PO<sub>4</sub>]Man( $\alpha$ 1,3)Man( $\alpha$ 1,4)-GlcN( $\alpha$ 1), (III) uma região de repetições de dissacarídeos fosforilados Gal( $\beta$ 1,4)Man ( $\alpha$ 1)- PO<sub>4</sub> e um oligossacarídeo neutro formando uma estrutura terminal do tipo “cap”. (Adaptado de Assis *et al.*, 2012a).

A caracterização estrutural do LPG demonstra uma completa conservação da âncora lipídica, do heptassacarídeo e da composição de dissacarídeos fosforilados. Contudo, o LPG apresenta intensa variabilidade na composição e sequência de açúcares ligados às unidades repetitivas e na composição do “cap” (McConville *et al.*, 1992, 1995; Ilg *et al.*, 1992; Soares *et al.*, 2004). Após a metaciclogênese, processo pela qual formas procíclicas se diferenciam em metacíclicas infectantes, a molécula de LPG dobra de tamanho devido ao aumento do número de unidades repetitivas (Sacks *et al.*, 1995; Barron & Turco, 2006). Mudanças qualitativas nas unidades repetitivas também ocorrem como no LPG de *L. major* no qual os resíduos de galactose são substituídos por arabinose nas formas metacíclicas (McConville *et al.*, 1992). Dentre os LPGs já caracterizados podemos citar *L. major* (McConville *et al.*, 1990); *L. mexicana* (Ilg *et al.*, 1992); *L. tropica* (McConville *et al.*, 1995, Soares *et al.*, 2004); *L. aethiopica* (McConville *et al.*, 1995); *L. donovani* (Sudão e Índia) (Sacks *et al.*, 1995; Mahoney *et al.*, 1999). Todos estes trabalhos, com exceção de *L. mexicana*, estudaram

preferencialmente espécies do Velho Mundo. Recentemente, mais espécies do Novo Mundo começaram a ter seus LPGs caracterizados incluindo *L. infantum* e *L. braziliensis*.

O segundo LPG de uma espécie do Novo Mundo foi da espécie *L. infantum* (cepa PP75), o qual possui resíduos de  $\beta$ -glicose em aproximadamente 1/3 das unidades repetitivas, ocorrendo uma diminuição na expressão dessas glicoses nas formas metacíclicas (Soares *et al.*, 2002) (Figura 5A). Similarmente, de cadeias laterais com até três glicoses foram também observadas no LPG de outra cepa de *L. infantum* (BH46), utilizada em nosso estudo (Coelho-Finamore *et al.*, 2011). O terceiro LPG caracterizado de uma espécie do Novo Mundo foi o de *L. braziliensis* (cepa M2903). Ao contrário do que acontece na cepa PP75 de *L. infantum*, o LPG de *L. braziliensis* não possui cadeias laterais em sua forma procíclica, enquanto um a dois resíduos de  $\beta$ -glicose podem são adicionados nas unidades repetitivas das formas metacíclicas (Soares *et al.*, 2005) (Figura 5B). Não sabemos qual a relevância destes polimorfismos na estrutura dos LPGs no processo de interação com macrófagos murinos.



**Figura 5: Diagrama esquemático da estrutura do LPG.** Formas (A) procíclicas de *L. infantum*; (B) procíclicas e metacíclicas de *L. braziliensis*. P= fosfato, Glc=glicose (Adaptado de Assis *et al.*, 2012a).

Do que foi exposto é possível concluir que o LPG constitui um fator de virulência multifuncional tendo importância na interação dos parasitos com o hospedeiro vertebrado e

invertebrado. Tendo em vista os polimorfismos observados nas unidades repetitivas dos LPGs de *L. infantum* e *L. braziliensis* e a ausência de estudos com estes glicoconjugados, este projeto tomou como foco, o estudo da interação entre macrófagos murinos e o LPG destas duas espécies. Como parte de um amplo projeto envolvendo a Glicobiologia das espécies do Novo Mundo, este projeto avaliou o papel destas moléculas na produção de NO, citocinas e ativação de MAPKs.

## **4 Metodologia**

### **4.1 Cepas de *L. infantum* e *L. braziliensis* e condições de cultivo**

As formas promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/2903) e *L. infantum* (MHOM/BR/1970/BH46) foram cultivadas até fase log de crescimento, para a obtenção de formas procíclicas promastigotas. Os parasitos foram mantidos em estufa BOD a 25°C em meio definido M199 (Sigma®), acrescido de soro fetal bovino (SFB) (10%), penicilina (100 U/ml), streptomomicina (50 µg/ml), glutamina (12,5mM), Hepes (40 mM), adenina (0,1 mM), 5-fluorocitosina (10 µg/mL), 6-biopterina (1 µg/mL) e hemina (0,0005%), pH 7,4. As curvas de crescimento foram obtivas para a determinação do melhor dia para extração de LPGs. Os parasitos foram semeados a partir de uma cultura de células na fase estacionária, em triplicata, em garrafas para cultivo celular na concentração inicial de  $5 \times 10^4$  parasitos/mL. O crescimento dos parasitos foi acompanhado por 11 dias, com contagens diárias no mesmo horário (Soares *et al.*, 2002).

### **4.2 Extração do LPG**

Os parasitos foram lavados em PBS e centrifugados a temperatura ambiente (7 min, 2100g). Para delipidação da amostra foram adicionados 2,5 mL de solução de clorofórmio/metanol (3:2 v/v) e 0,5 ml da solução de cloreto de magnésio a 4 mM. O material foi sonicado e centrifugado (7 min, 2100g) resultando em uma fase sólida intermediária com a qual o procedimento foi repetido. À fase sólida foram adicionados 2,5 mL da solução de cloreto de magnésio a 4 mM. O material foi sonicado e centrifugado (7 min, 2100g) para a extração de proteínas. O sobrenadante foi desprezado e o procedimento repetido. Em seguida, foram adicionados 3,0 mL da solução de clorofórmio/metanol/água (10:10:3 v/v) e 0,5 mL da solução de clorofórmio/metanol (1:1 v/v) apenas na primeira etapa. O material foi submetido

a três etapas de sonicação e centrifugação (7 min, 2100g) nas quais o sobrenadante contendo os GIPLs foi obtido.

Para extração do LPG foram adicionados 2,5 mL ESOAK (água/etanol/etil éter/piridina/NH<sub>4</sub>OH; 15:15:5:1:0,017 v/v) ao sedimento resultante que foi sonicado e centrifugado (7 min, 2100g). O procedimento foi repetido três vezes e o sobrenadante contendo LPG foi evaporado utilizando-se nitrogênio gasoso em banho a 45°C (Orlandi e Turco, 1987).

### **4.3 Purificação e dosagem do LPG**

A amostra contendo LPG foi solubilizada em 1 mL da solução ácido acético 0,1 N/cloreto de sódio 0,1 N, sonicada e submetida a uma cromatografia de interação hidrofóbica na qual a resina fenil Sepharose foi utilizada. Aproximadamente 2 mL desta resina foram empacotados em uma coluna Bio-Rad (#731-1550) e lavados com 6 volumes de ácido acético 0,1 N/NaCl 0,1 N. Após o último mL desta solução penetrar na coluna, a amostra contendo LPG ressuspensa na mesma solução foi adicionada. Em seguida, o material foi lavado de acordo com a seguinte seqüência: 1 mL de acético 0,1 N/NaCl 0,1 N, 1 mL de ácido acético 0,1 N, 1 mL de dH<sub>2</sub>O. Foram utilizados 4 mL de ESOAK para eluir o LPG. A amostra foi novamente evaporada com nitrogênio gasoso em banho maria a 45°C e, em seguida, solubilizada em 100 µL de água milli-Q e armazenada a 4° C (Soares *et al.*, 2002). O LPG foi dosado pelo método fenol-ácido sulfúrico segundo Dubois *et al.*, 1956.

### **4.4 Obtenção de células**

Os camundongos foram mantidos no Biotério do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ de acordo com o Manual de Uso e Manuseio de Animais Experimentais (“Guide for the Care and Use of Experimental Animals”) (Olfert *et al.*, 1993). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de ética em Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (Protocolo P-0297-06). O protocolo de manuseio para os camundongos “knock-out” foi aprovado pela comissão Nacional de Biosegurança (CTNBio) (protocolo #01200.006193/2001-16).

Os camundongos das linhagens BALB/c, C57BL/6, TLR2 (-/-) e TLR4 (-/-) foram inoculados intraperitonealmente com 2 mL de solução de tioglicolato 3%. Após 72 horas, os animais foram eutanasiados com CO<sub>2</sub> e os macrófagos recuperados por lavagem da cavidade



peritoneal utilizando meio RPMI gelado. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer e ressuspensas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Aliquotas de 200 $\mu$ L foram colocadas em uma placa de 96 poços de forma que a concentração final fosse de 3,5 X 10<sup>5</sup> células/poço. A placa foi incubada por 1 hora à 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> para adesão das células. Em seguida, o meio foi trocado por meio RPMI suplementado (10% SFB).

Os parasitos quando utilizados no ensaio *in vitro* foram mantidos a 25° C em meio M199 suplementado com 10% de SFB até a fase estacionária de crescimento. Em seguida, eles foram contados em câmara de Neubauer, lavados uma vez com PBS e ressuspensos em meio RPMI suplementado (10% SFB). Após o período de incubação de 18 horas, os macrófagos foram lavados com meio RPMI e à cultura foram adicionados da suspensão de parasitos para uma concentração final equivalente a 10 parasitos/macrófago (MOI 10:1).

#### **4.5 Curva dose resposta utilizando células RAW**

Para se determinar a melhor concentração de LPG para os ensaios biológicos, células da linhagem contínua (RAW 264.7) foram usadas nos experimentos de padronização. As células foram tripsinizadas, diluídas em RPMI suplementado com 10% SFB e contadas em câmara de Neubauer. As células foram aplicadas em uma placa de 96 poços (2 X 10<sup>5</sup> células/poço). Em uma placa as incubações foram realizadas em diferentes concentrações de LPG na ausência de IFN- $\gamma$ . Na outra, as células foram primadas com 3U/mL (Hu *et al.*, 2002) de IFN- $\gamma$ , por 18 horas (Mosser e Zhang, 2008) antes da adição de LPG (20, 10, 5, 1, 0.5 e 0.1  $\mu$ g/mL) de LPG de ambas espécies. LPS (100 ng/mL) foi utilizado como controle positivo em todos os experimentos. Cada amostra foi preparada em triplicata. A placa foi incubada (37° C, 5% CO<sub>2</sub>, 24 e 48 h). A quantificação de NO foi realizada pelo método de Griess (Griess Reagent System, 2009).

#### **4.6 Curva dose resposta utilizando macrófagos BALB/c**

A fim de confirmar se o perfil observado em células RAW poderia aplicar-se aos experimentos com macrófagos peritoneais de camundongos, estes foram repetidos apenas para a linhagem BALB/c na presença de IFN- $\gamma$ . As células foram aplicadas em uma placa de 96 poços (3,5 X 10<sup>5</sup> células/poço) e as condições de incubação foram idênticas ao item anterior.

#### **4.7 Avaliação da produção de NO e citocinas após estimulação por LPG**

Nos experimentos anteriores de padronização, ficou estabelecido que a melhor concentração de LPG fosse de 10 µg/mL para ambas as espécies. Esta foi utilizada em todos os experimentos subsequentes de NO e citocinas para todas as linhagens de camundongos (BALB/c, C57BL/6, TLR2 (-/-) e TLR4 (-/-)). Foram realizados dois experimentos em duplicata. Os macrófagos foram incubados da mesma maneira do item anterior e a quantificação de NO foi realizada pelo método de Griess. A dosagem de citocinas por determinada pela citometria de fluxo conforme descrito abaixo.

#### **4.8 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo (CBA multiplex)**

A concentração de citocinas (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IFN-γ, e TNF-α) nos sobrenadantes foi determinada usando o Kit *CBA Mouse Cytokine assay kits* (BD<sup>®</sup> Biosciences, CA/EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. As medições foram realizadas no citômetro *FACS Calibur* (Beckton Dickinson, Mountain View, CA, EUA). A aquisição de dados foi realizada utilizando o programa *Cell-Quest<sup>TM</sup> software package* fornecido pelo fabricante. A análise de dados foi feita no programa *FlowJo software 7.6.4* (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA). Foi realizada uma aquisição de 1800 eventos (mínimo de 300 eventos por bead) para cada preparação. Os resultados representam a média de dois experimentos em duplicata.

#### **4.9 Inibição da produção de NO em macrófagos estimulados com LPS**

Para avaliar se o LPG teria a capacidade de inibir a produção de NO induzido por LPS como observado nas espécies do Velho Mundo (Proudfoot *et al.*, 1996), foram realizados experimentos de inibição. Nestes, os macrófagos procedentes de camundongos BALB/c foram primados com 3 U/mL de IFN-γ, por 6 horas. Em seguida, os mesmos foram incubados com LPG (10 µg/mL) por 18 horas. Após este período, o LPS (100 ng/mL) foi adicionado ao meio. O sobrenadante foi coletado após 24 horas e a concentração de nitrito determinada pelo método de Griess. Paralelamente, foram utilizadas amostras não primadas. Os resultados representam a média em triplicata.

#### **4.10 Preparação dos lisados celulares e western-blot das MAPKs**

Macrófagos peritoneais da linhagem BALB/c foram extraídos e purificados como descrito no item 4.4. As células foram plaqueadas ( $3,5 \times 10^6$  células/poço), em uma placa de 6 poços. Os LPGs de *L. braziliensis* e *L. infantum* ( $10\mu\text{g/mL}$ ) foram adicionados e incubados por 0, 5, 15, 30 e 45 minutos. LPS ( $100\text{ng/mL}$ ), controle positivo, foi incubado apenas por 45 minutos. As células foram lavadas e lisadas em tampão de lise (Tris-HCl a 20 mM, pH 7.0, Triton X-100 a 1%, ortovanadato de sódio a 1 mM, fluoreto fenil-metil-sulfonila (PMSF) 1mM, fluoreto de sódio (NaF) a 50mM, NaCl 150mM, EDTA a 5 mM, Glicerol 10%, Ditiotreitól (DTT) a 0,5mM e coquetel inibidor de protease Sigma®).

Os lisados foram homogeneizados e centrifugados a  $13000g$  por 20 min a  $4^\circ\text{C}$  (ROUSE et al., 1994). Os lisados foram submetidos à eletroforese em gel 10% SDS-PAGE (100V) (Laemmili, 1970) e transferidos para uma membrana de nitrocelulose e a membrana bloqueada por 1 hora (caseína a 5% em TBS-Tween 20 0,1%). A membrana foi lavada 3X em TBS-Tween 20 a 0.1% e incubada com os anticorpos primários, capazes de reconhecer as formas dualmente fosforiladas das MAPK (ERK-1/ERK-2, SAPK-2/p38) na diluição de 1:250 e 1:1000, respectivamente, por 16 horas a  $4^\circ\text{C}$ . A membrana foi lavada 3X em TBS-Tween 20 a 0.1% e incubadas por 1 horas com anticorpos secundários anti-IgG conjugados com peroxidase (1:500 e 1:5000) e as reações visualizadas usando Luminol.

#### **4.11 Análise estatística**

Os dados obtidos após a estimulação dos macrófagos com as diferentes cepas de *Leishmania* e seus respectivos LPGs foram representados através da média  $\pm$  desvio-padrão. O teste Shapiro-Wilk foi realizado para avaliar a hipótese nula de distribuição Gaussiana dos dados (considerando  $p > 0,05$ ) (Shapiro, 1965). Os testes T student e ANOVA foram realizados para comparação das médias entre amostras independentes e entre os grupos, respectivamente. Os dados foram analisados com a utilização do software GraphPad Prism 5.0 e valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Os gráficos foram produzidos utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0.

## 5 Resultados

### 5.1 Curva de crescimento de promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/70/BH46) e *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/2903)

Para se determinar o melhor momento para obtenção de um número máximo de parasitos na fase log de crescimento para a extração do LPG, foram realizadas curvas de crescimento. O crescimento máximo para *L. braziliensis* foi atingido no sexto dia, alcançando uma contagem máxima de  $2,10 \times 10^7$  parasitos/mL. *Leishmania infantum* atingiu seu pico máximo no nono dia na concentração de  $1,3 \times 10^7$  parasitos/mL. Por esta razão, a extração do LPG foi realizada entre os dias 5 e 6 para *L. braziliensis* e entre os dias 7 e 9 para *L. infantum* (Figura 6).

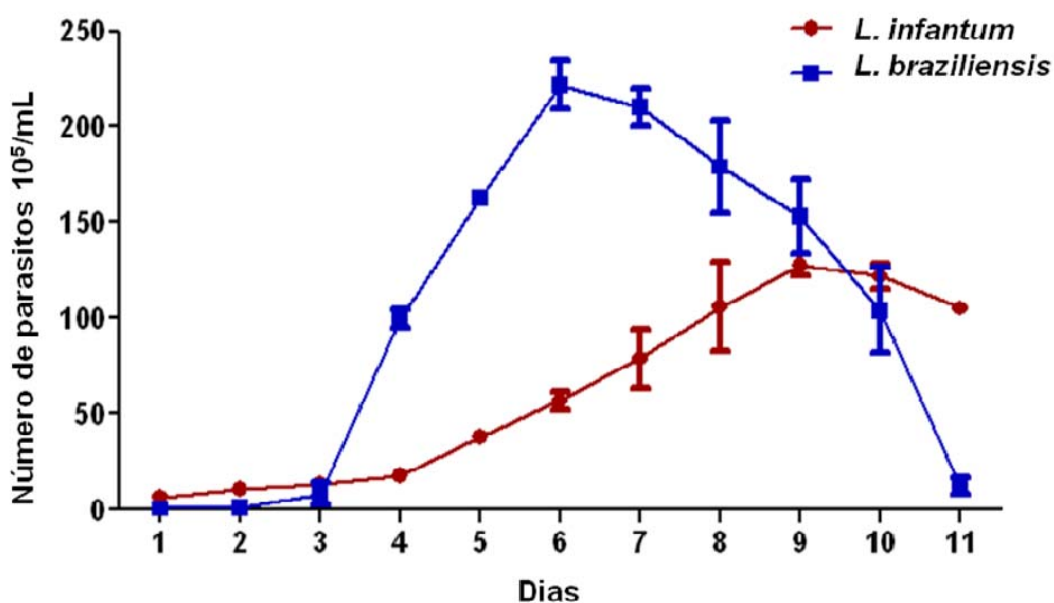


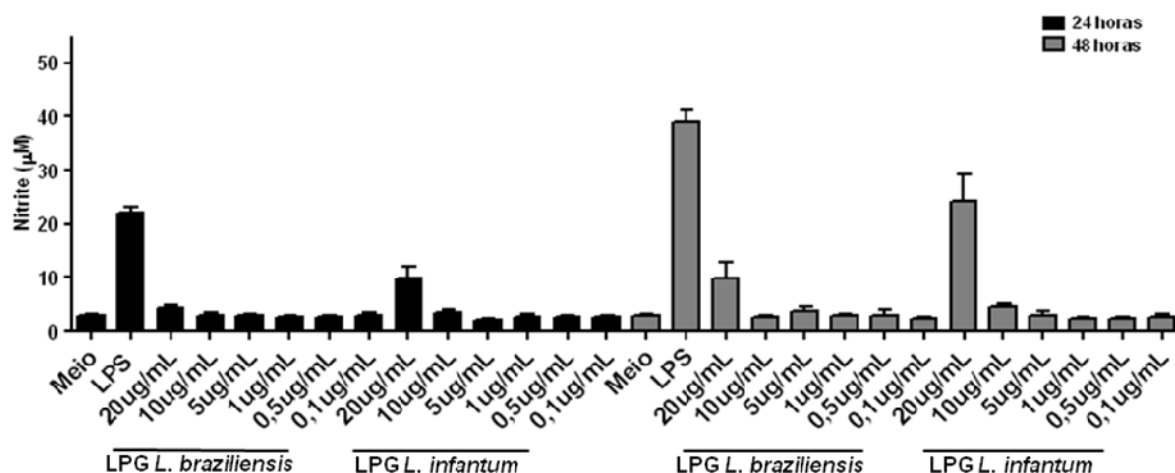
Figura 6: Curva de crescimento de *L. braziliensis* e *L. infantum*. Curva realizada em Meio M199 acrescido de 10% de SFB a 26 °C.

## 5.2 Produção de NO – Curva de produção

Com o intuito de definir a melhor concentração de LPG a ser usada nos experimentos de indução de NO/citocinas e ativação das MAPK, uma curva dose-resposta foi realizada utilizando macrófagos de linhagem contínua (Raw 264.7).

Para as células não primadas, não houve produção significativa de nitrito na maioria das concentrações de LPG em 24 horas, exceto 20 µg/mL para *L. infantum* e para LPS (controle positivo) (Figura 7A). Após 48 h, apenas as concentrações de LPG de 20µg/mL para ambas as espécies foram capazes de desencadear a produção de NO. Esses resultados foram consistentes com os previamente observados na literatura para GPI-mucinas de *T. cruzi* e LPGs de espécies do Velho Mundo, nos quais âncoras de GPI são capazes de ativar a produção de NO e citocinas apenas após estímulo prévio com IFN- $\gamma$  (Proudfoot *et al.*, 1996; Camargo *et al.*, 1997). Por outro lado, em células primadas, a produção de nitrito foi dose-dependente após 24 e 48 h (Figura 7B). Para as células de linhagem contínua o LPG de *L. braziliensis*, na concentração de 20µg/mL, induziu uma maior produção de NO do que o de *L. infantum* para a mesma concentração (Figura 7B). Essa diferença na produção foi maior (1,6X) após 48 horas de incubação. Estes resultados demonstram que ambos os LPGs foram capazes de ativar as células RAW 264.7 de forma mais eficaz na presença de IFN- $\gamma$ .

A



B

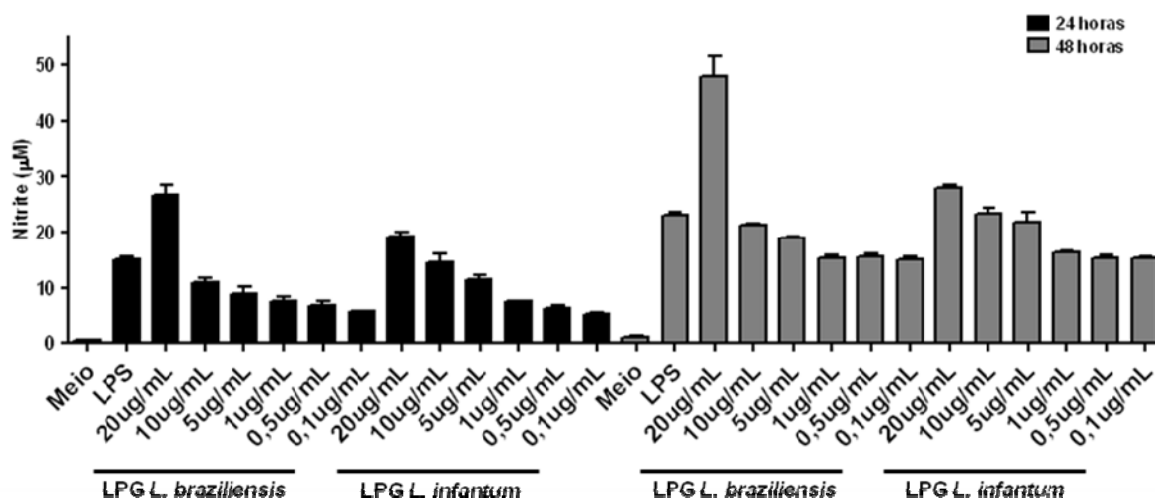
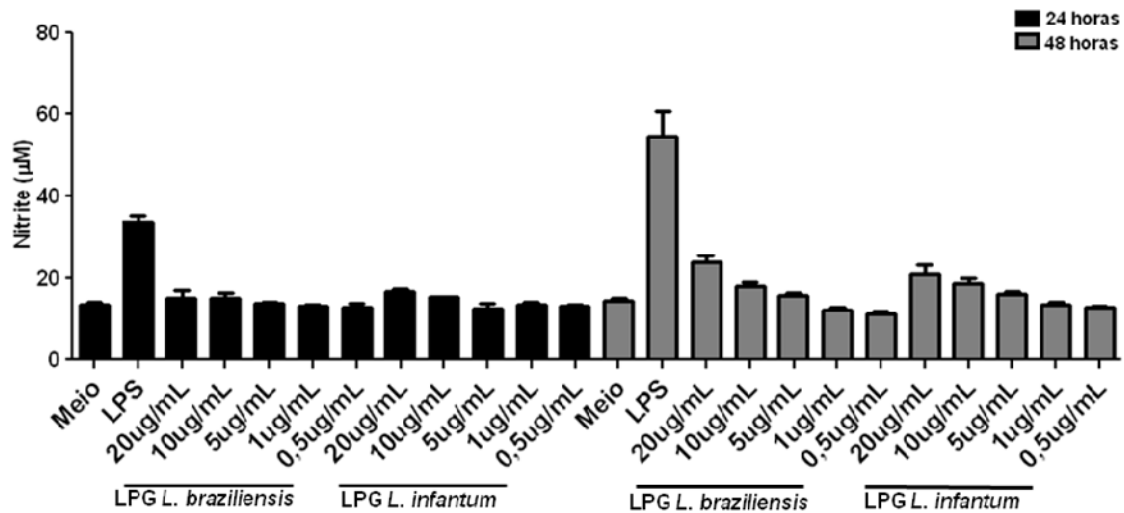


Figura 7: Indução da produção de nitrito em macrófagos de linhagem contínua Raw 264.7. Células estimuladas com diferentes concentrações de LPG. (A), células não primadas e (B), células primadas IFN-g. Controle positivo utilizou LPS (100ng/mL).

Uma segunda curva foi realizada para avaliar se macrófagos peritoneais de BALB/c apresentariam o mesmo perfil dose-resposta observado nas células RAW 264.7. Não foi observada diferença significativa para a produção de NO entre os macrófagos de BALB/c estimulados pelo LPG de *L. braziliensis* e *L. infantum* em 24 horas. Similarmente às células RAW 264.7, o perfil dose-resposta foi observado após 48 horas de incubação (Figura 8). A concentração máxima observada foi de 25µM de nitrito nas amostras estimuladas com 20µg/mL de *L. braziliensis* LPG. Nos macrófagos murinos, os dois tipos de LPGs apresentaram o mesmo perfil de indução de NO para as concentrações de 20 e 10 µg/mL, não havendo diferença significativa para ambas as espécies ( $P > 0.05$ ).



**Figura 8: Indução da produção de nitrito em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.** Macrófagos primados com IFN- $\gamma$  e estimulados com diferentes concentrações de LPG de *L. infantum* e *L. braziliensis* após 24 e 48h. Controle positivo utilizou LPS (100ng/mL).

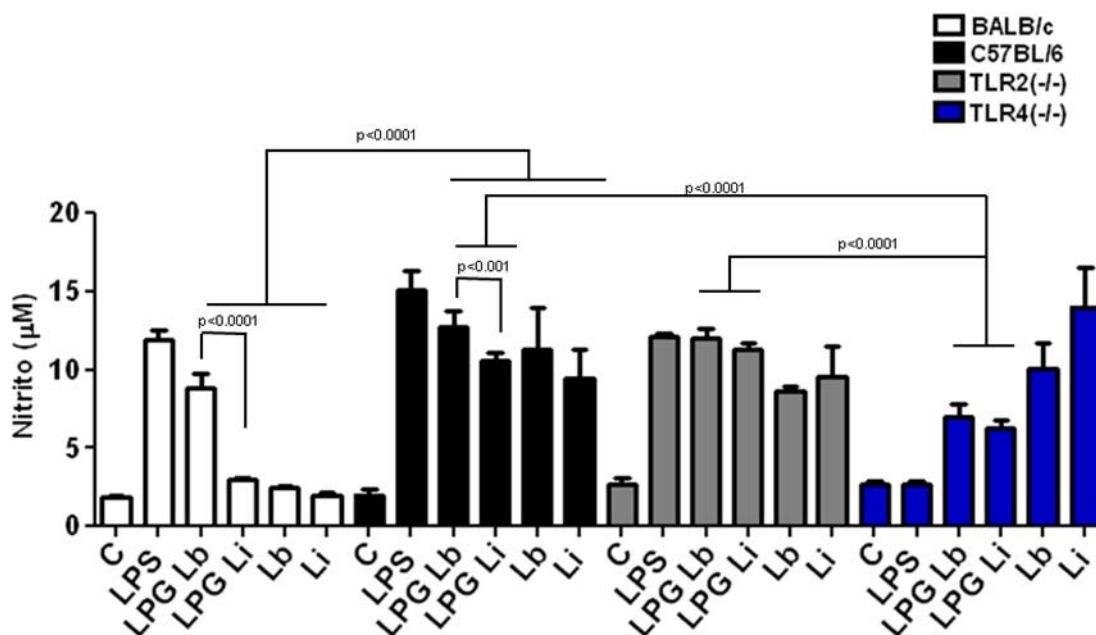
Tanto as células de linhagem contínua quanto as células peritoneais apresentaram perfil semelhante para a produção de nitrito, confirmando assim a indução dose-resposta dos LPGs. Baseado nestes resultados, a concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  foi escolhida para os experimentos subsequentes de indução de citocinas, nitrito e ativação de MAPKs com as outras linhagens de camundongos.

### 5.3 Produção de NO

Com o objetivo de avaliar uma possível participação dos receptores TLR2 e TLR4 na sinalização, macrófagos peritoneais primados com IFN- $\gamma$ , provenientes de camundongos BALB/c, C57BL/6, TLR2 (-/-) e TLR4 (-/-) foram estimulados com LPG (10  $\mu\text{g/mL}$ ) e parasitos vivos (proporção de 10:1) por 48h. Nota-se uma maior produção de NO em camundongos C57BL/6 do que em BALB/c estimulados com LPG e parasitos vivos (Figura 9) (Anova,  $P < 0,0001$ ). Foi observado também para estas linhagens que o LPG de *L. braziliensis* induziu uma maior produção de NO do que o de *L. infantum* (teste t,  $P < 0,01$ ). Entretanto, esta diferença não foi observada em macrófagos “knock outs” ( $P > 0,05$ ).

Comparando-se os camundongos da linhagem selvagem (WT) e knock-out de C57BL/6, o perfil de produção de NO entre o WT e TLR2 (-/-) foi similar ( $P > 0,05$ ). Contudo, em células TLR4 (-/-) ocorreu uma diminuição significativa na produção de NO após a estimulação pelo LPG das duas espécies em comparação com o WT e TLR2 (-/-) (Anova,

$p < 0,0001$ ). Sugerindo assim, uma participação maior dos receptores TLR4 na sinalização do LPG. Entretanto, uma significativa produção de nitrito foi observada para os macrófagos estimulados com LPG e parasitos vivos nestes camundongos, não descartando a participação de TLR2 neste processo e de outras moléculas do parasito ( $P < 0.0001$ ). Porém, não houve diferença significativa na estimulação por parasitos vivos comparando-se C57BL/6 (WT) com TLR2 (-/-) e TLR4 (-/-) ( $P > 0.05$ ). Conforme esperado, LPS estimulou a produção de nitrito em todas linhagens, exceto TLR4 (-/-).



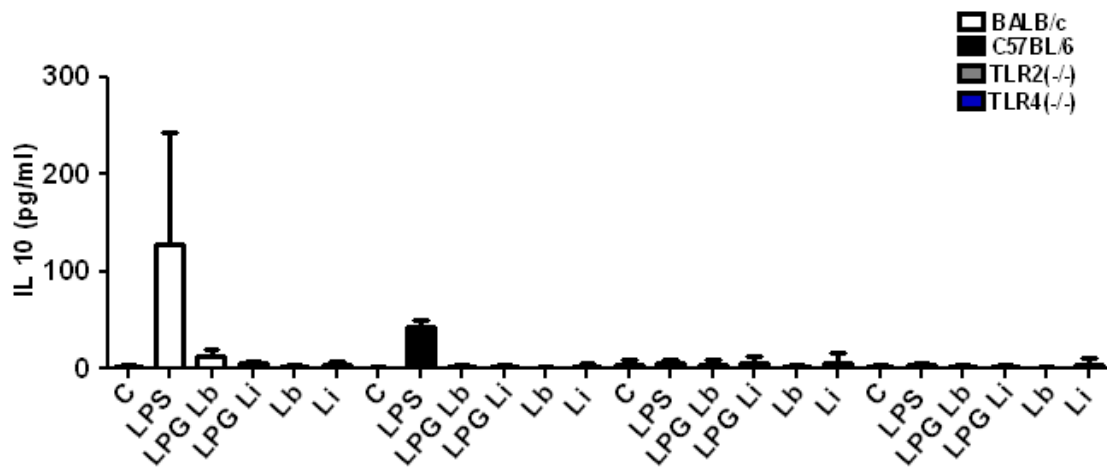
**Figura 9: Indução da produção de nitrito.** Macrófagos estimulados com LPG (10 µg/mL) e promastigotas de *Leishmania* (10:1). LPS= lipopolissacarídeo; LPG Lb= Lipofosfoglicanos de *L. braziliensis*; LPG Li= Lipofosfoglicanos de *L. infantum*; Lb= promastigotas de *L. braziliensis*; Li= promastigotas de *L. infantum*. As concentrações de NO foram quantificadas pela reação de Griess após 48 horas de incubação. Os resultados representam a média de dois experimentos em duplicata.



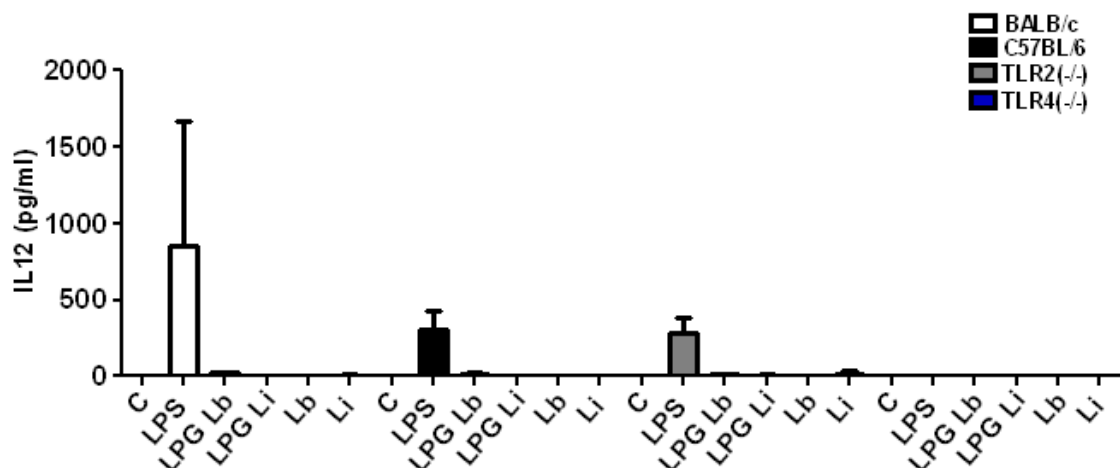
#### 5.4 Produção de citocinas

De maneira semelhante aos experimentos de NO, os sobrenadantes de culturas de macrófagos das quatro linhagens foram submetidos à citometria de fluxo para a dosagem de citocinas. Não foi observada nenhuma produção significativa de IL-2, IL-4, IL-10, IL-12p40 e IFN- $\gamma$  após estimulação com LPGs e parasitos vivos. Na Figura 10 (A e B) estão representados apenas os resultados para IL-10 e IL-12, onde apenas o controle positivo (LPS) induziu a produção destas citocinas na maioria das linhagens.

A

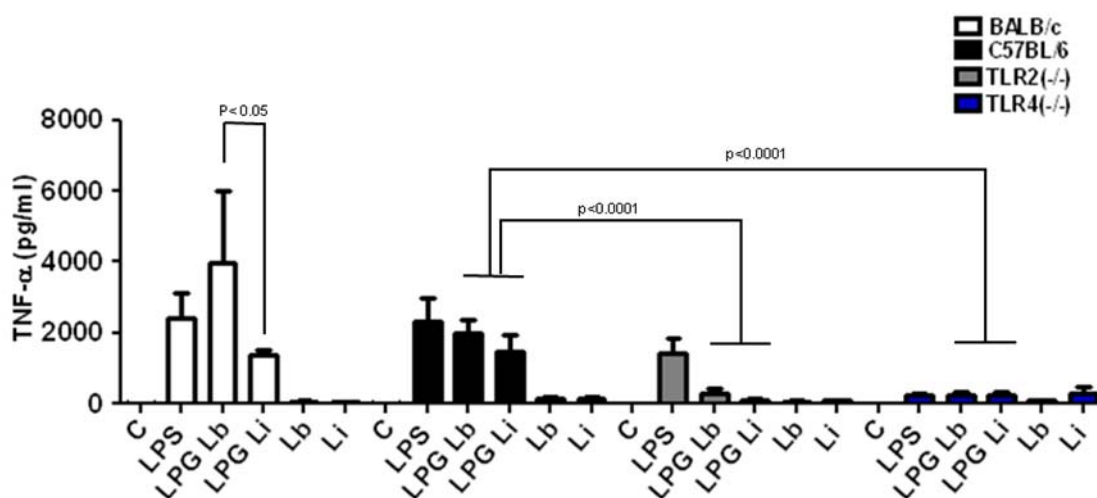


B



**Figura 10: Indução da produção de IL-10 (A) e IL-12 (B).** Macrófagos estimulados com LPG (10  $\mu$ g/mL), LPS (100ng/mL) e promastigotas de *L. braziliensis* (Lb) e *L. infantum* (Li) (10:1) após 48 h. Legenda C=controle negativo; LPS= lipopolissacarídeo; LPG Lipofosfoglicanos. Os resultados representam a média de dois experimentos em duplicata.

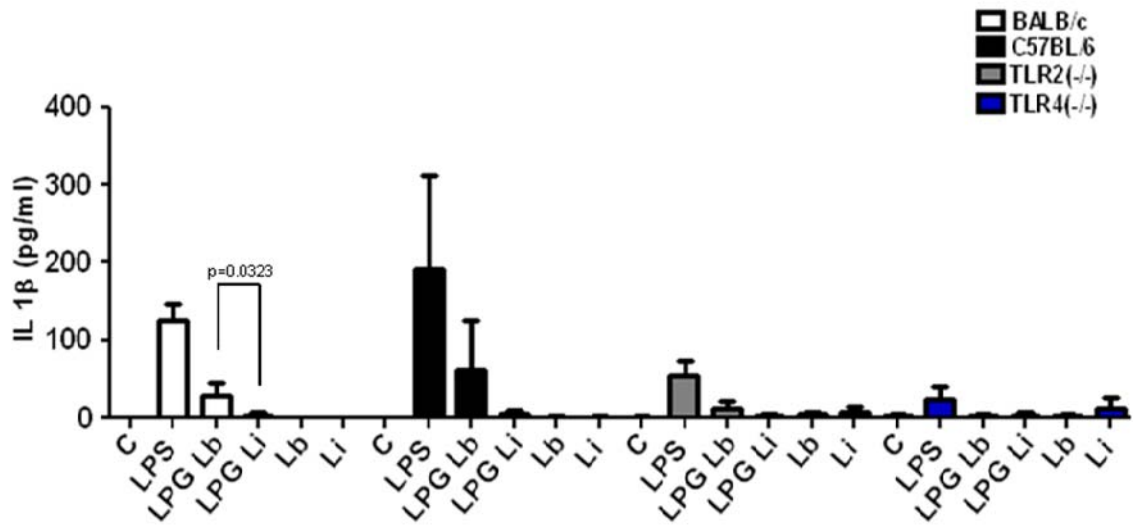
Para as outras citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), foi possível detectar a sua produção após estimulação com LPGs. No caso de TNF- $\alpha$ , semelhante ao observado para NO em camundongos BALB/c (Figura 10), o LPG de *L. braziliensis* induziu uma produção maior (2,5 X) do que o de *L. infantum* (teste t, P < 0,05) (Figura 11). Por outro lado, o LPG induziu níveis muito baixos, mas detectáveis, de TNF- $\alpha$  em camundongos TLR2 (-/-) e TLR4 (-/-) (Figura 11). Como esperado, o LPS (controle positivo) induziu a produção de TNF- $\alpha$  em BALB/c, C57BL/6 e TLR2 (-/-). A diferença na produção de TNF- $\alpha$  foi estatisticamente significativa entre os camundongos C57BL/6 e TLR2 (-/-) e TLR4 (-/-) (ANOVA, P < 0.001).



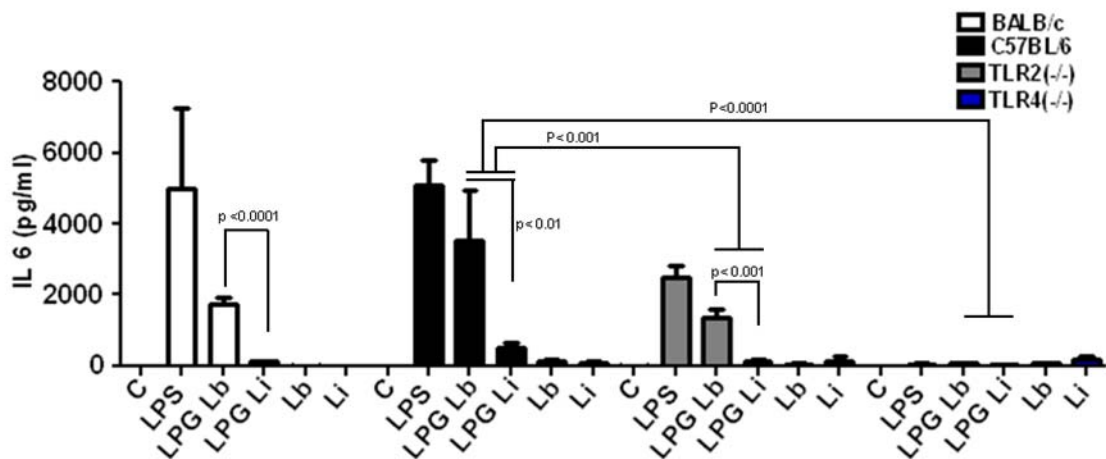
**Figura 11: Indução da produção de TNF- $\alpha$ .** Macrófagos estimulados com LPG (10  $\mu$ g/mL), LPS (100ng/mL) e promastigotas de *L. braziliensis* (Lb) e *L. infantum* (Li) (10:1) após 48 h. Legenda C=controle negativo; LPS= lipopolissacarídeo; LPG Lipofosfoglicanos. Os resultados representam a média de dois experimentos em duplicata.

Em geral, para IL-1 $\beta$  e IL-6, o LPG de *L. braziliensis* induziu uma maior produção destas citocinas do que o de *L. infantum* nos camundongos BALB/c, C57BL/6 e TLR2 (-/-) (Figura 12A e B) (teste t, P < 0.05). Para IL-6, foi observada diferença estatística significativa entre os camundongos C57BL/6 e os camundongos TLR2 (-/-) e TLR4 (-/-) (ANOVA, p < 0,001), estimulados pelo LPG de ambas as espécies. Estes dados mais uma vez, confirmam para o envolvimento de TLR4 na sinalização por LPG.

A



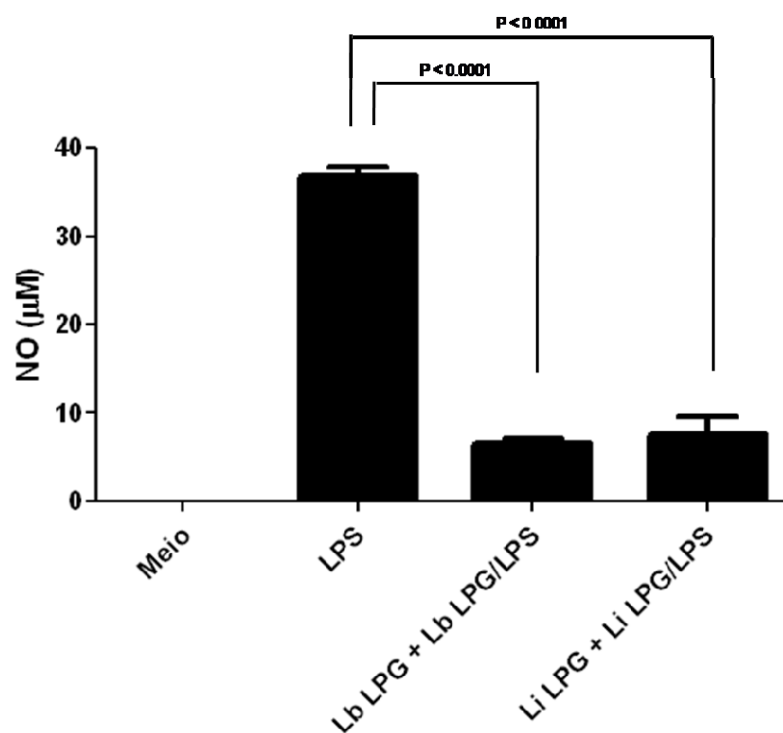
B



**Figura 12: Indução da produção de IL-1β (A) e IL-6 (B).** Macrófagos estimulados com LPG (10 µg/mL), LPS (100ng/mL) e promastigotas de *L. braziliensis* (Lb) e *L. infantum* (Li) (10:1) após 48 h. Legenda C=controle negativo; LPS= lipopolissacarídeo; LPG Lipofosfoglicanos. Os resultados representam a média de dois experimentos em duplicata.

### 5.5 Inibição da produção de nitrito pelo LPG em células peritoneais estimuladas com LPS

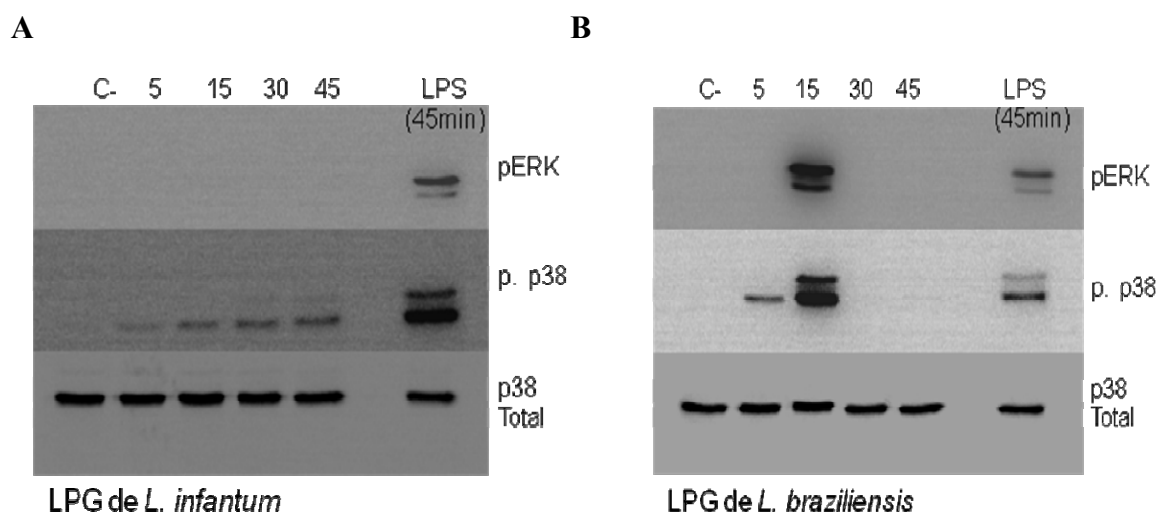
Neste trabalho, os LPGs de ambas as espécies induziram a produção de nitrito em macrófagos (Figuras 7B e 8). Estudos anteriores demonstraram que o PG de *L. major* era capaz de inibir a produção de nitrito em células J774 (Proudfoot *et al.* 1996). Com este intuito, macrófagos BALB/c primados foram incubados por 18h com LPG, lavados e ressuspensas em RPMI contendo LPS (100ng/mL) e LPG (10 µg/mL) (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 24h). Os LPG de ambas as espécies inibiram em mais de 79% a produção de nitrito em células estimuladas com LPS (Figura 13).



**Figura 13: Inibição da produção de nitrito pelo LPG em macrófagos posteriormente estimulados com LPS.** Legenda: Meio, controle negativo; LPS, lipopolissacarídeo (100ng/mL); LbLPG+LPS/LbLPG, células incubadas por 18 horas com LPG de *L. braziliensis* (LbLPG) e depois estimuladas com LbLPG+LPS; LiLPG, células incubadas por 18 horas com LPG de *L. infantum* (LiLPG) e estimuladas com LiLPG+LPS. Os resultados representam a média em triplicata.

## 5.6 Modulação da ativação de MAPK

Assim como nas espécies do Velho Mundo, os resultados anteriores também evidenciaram o papel da ativação de TLRs por LPGs de espécies do Novo Mundo. Deste modo, com o objetivo de investigar o seu papel nas vias de sinalização de macrófagos, as MAPKs (ERK e p38) foram avaliadas após estimulação por LPGs. Não foi detectada ativação de ERK pelo LPG de *L. infantum*. Ao contrário, p38 apresentou um perfil de ativação progressivo alcançando maior atividade aos 45 minutos (Figura 14A). Diferente do observado para *L. infantum*, uma significativa ativação de ERK e p38 foi detectada após estimulação pelo LPG de *L. braziliensis* atingindo um pico aos 15 minutos (Figura 14B). Em conjunto, esses dados indicam que os LPGs de *L. infantum* e *L. braziliensis* estimulam diferencialmente a cinética de ativação de p38 e ERK em macrófagos.



**Figura 14:** Cinética de ativação das MAPKs (ERK e p38) pelo LPG de (A), *L. infantum* e (B), *L. braziliensis*. Macrófagos peritoneais provenientes de camundongos BALB/c foram estimulados por 5, 15, 30 e 45 minutos com LPG (10 µg/mL) e por 45 minutos com LPS (100ng/mL). As formas dualmente fosforiladas de ERK e p38 ativadas foram detectadas por Western blot. C, controle negativo e LPS, lipopolissacarídeo. p38 total foi utilizada como normalizador.

## 6 Discussão

Dentre todos os glicoconjugados conhecidos em *Leishmania* o mais estudado é o LPG, sendo que mutantes deficientes para a síntese desta molécula não são capazes de estabelecer infecção tanto no hospedeiro vertebrado quanto invertebrado. Este trabalho pretendeu estudar a interação deste glicoconjugado com macrófagos murinos de duas espécies de *Leishmania* epidemiologicamente importantes no Brasil. Os LPGs destas espécies variam em sua composição bioquímica conforme observado na Figura 5. Estes polimorfismos foram avaliados durante na interação com macrófagos murinos, uma vez que não se sabe até que ponto estas variações interferem na produção de NO, citocinas e sinalização.

A imunopatogenia das leishmanioses apresenta aspectos extremamente importantes em relação à complexa interação entre os parasitos e as respostas imunes dos vertebrados (Assis *et al.*, 2012a). Estudos *in vivo* têm demonstrado que as primeiras horas após a infecção são críticas para a montagem da resposta celular subsequente e diferenciação das células TCD4+ principalmente nas infecções por protozoários (Gazzinelli *et al.*, 2004). O modelo murino de Leishmaniose cutânea tem sido muito utilizado nos estudos de respostas imunes por *L. major* tendo sido importante para o estabelecimento do paradigma Th1/Th2 (Liew *et al.*, 1997). Porém, este mesmo paradigma não se aplica a outras espécies de *Leishmania*, que exibem um amplo espectro de manifestações clínicas (Desjeux *et al.*, 2004). Em infecções por *L. braziliensis*, observa-se que a polarização Th1/Th2 não é bem definida. Nesta espécie, a resposta à infecção não ocorre devido a um fenótipo Th1 eficiente, e sim por falha na montagem da resposta Th2, apresentando níveis de IL-4 de 10-15 vezes menor do que nos animais infectados por *L. major* (Dekrey *et al.*, 1998).

*In vivo* e *in vitro*, um dos aspectos importantes nos eventos iniciais da infecção por *Leishmania* é a produção de NO por macrófagos que é dependente de IFN- $\gamma$  (Mosser e Edwards, 2008). Em nosso trabalho, macrófagos primados e estimulados com LPG de *L. braziliensis* produziram níveis maiores de NO. Nossos resultados confirmam os da literatura de que macrófagos primados são capazes de produzir NO em presença de LPG, e que essa produção é variável entre as espécies e cepas (Proudfoot *et al.*, 1996; Coelho-Finamore *et al.*, 2011). Além disso, foi observada uma resposta dose-dependente na produção de NO (Figuras 7 e 8B). Entretanto, a concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$  apresentou um perfil de resposta exacerbado nestes ensaios, sendo escolhida a concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  para todos os experimentos. De modo semelhante, não foi detectada a produção de NO por macrófagos não-primados (Figura

8A) confirmando os dados anteriores da literatura para âncoras de GPI (Proudfoot *et al.*, 1996; Camargo *et al.*, 1997).

Os dados apresentados neste trabalho demonstraram diferenças significativas na produção de citocinas e NO entre os camundongos C57BL/6 e BALB/c expostos a LPG. De forma geral, camundongos C57BL/6 estimulados com LPG de *L. infantum* e *braziliensis* apresentaram uma maior produção de NO, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ; com exceção do LPG de *L. braziliensis* que induziu uma maior produção de TNF- $\alpha$  em camundongos BALB/c. Outra diferença marcante entre esses camundongos foi relacionada com a produção de NO. Camundongos C57BL/6 induziram uma maior produção de NO em respostas ao LPG, que os camundongos BALB/c (Figura 9). Estas variações podem ser resultado também pelo perfil imuno-genético do hospedeiro aos antígenos da *Leishmania* (Silveira *et al.*, 2009; Assis *et al.*, 2012a). Em nosso trabalho, não houve diferença entre o perfil de ativação por parasitos de ambas as espécies em todas as linhagens observadas, estas foram determinantes apenas após estimulação com as moléculas intactas.

Estudos anteriores realizados *in vivo* demonstraram claramente que as citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ), assim como várias quimiocinas, são induzidas nos estágios iniciais das infecções por parasitos de *L. major* e *L. donovani*, causadoras da LC e LV, respectivamente. Contudo, promastigotas de *L. major* mostraram ser melhores ativadoras do que *L. donovani* (Matte *et al.*, 2001). Essa diferença no perfil de ativação das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e de NO, também foi observada em macrófagos estimulados com LPG de *L. braziliensis* e *L. infantum*. Este dado é interessante, uma vez que reflete um papel estimulatório do LPG similar ao observado para os parasitos de espécies do Velho Mundo que tem imunopatologias semelhantes às espécies do Novo Mundo deste estudo.

Neste trabalho, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 estimulados com LPG de *L. infantum* produziram níveis menores de citocinas e NO do que aqueles estimulados com LPG de *L. braziliensis*. O LPG de *L. infantum* induziu uma menor produção de TNF- $\alpha$ . Esses resultados são semelhantes a anteriores onde diferentes LPGs de *Leishmania* induziram à produção de níveis variáveis de TNF- $\alpha$  (de Veer *et al.*, 2003). Em adição, nossos resultados demonstraram um perfil diferencial de IL-6 e NO, com ausência de produção de IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-12 para o LPG de *L. infantum*. Esses dados são semelhantes aos observados para a LV humana, onde uma imunossupressão e resposta mista Th1 e Th2 são observadas (WHO, 2010). Estudos *in vitro* demonstraram que a incapacidade transitória de induzir resposta imune celular contra antígenos do parasito pode estar relacionada com ausência de proliferação celular, produção de IL-2 ou IFN- $\gamma$ , durante a infecção (Holaday *et*

*al.*, 1993). De modo semelhante, os LPGs de ambas as espécies em nosso estudo não induziram níveis detectáveis de IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ . Adicionalmente, não foi observada produção de IL-10 e IL-12, provavelmente indicando um papel inibitório dos LPGs para estas citocinas. Níveis elevados de IL-10 são frequentemente observados em pacientes com LV por *L. infantum* (Bhowmick *et al.*, 2009). Entretanto, após o tratamento estes níveis caem sendo acompanhados por um aumento na produção de IL-12 (Carvalho *et al.*, 1981; 1985; 1989). Aqui a citocina IL-12, não foi produzida após estimulação com LPGs. Provavelmente, isto ocorreu devido a uma inibição de sua síntese. Estes resultados são semelhantes aos observados *L. infantum* e *L. braziliensis*, que sob as mesmas condições não ativaram a produção de IL-12, mas foram capazes de inibir a sua síntese em macrófagos estimulados com LPS pré-incubados com GIPLs destas espécies (Assis *et al.*, 2012b). Outros estudos também demonstraram o papel do LPG em regular a produção de NO (Proudfoot *et al.*, 1996) e IL-12 pelos macrófagos (Piedrafita *et al.*, 1999). É importante ressaltar que a ausência na produção de IL-12 em nosso trabalho não ocorreu devido à produção de IL-10, já que não foi observada a produção desta citocina.

Analisando a produção de mediadores induzidos pelo LPG de *L. braziliensis* percebe-se uma tendência mais pró-inflamatória do que a de *L. infantum*, com níveis mais elevados de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e NO. Esse perfil também é similar ao encontrado na infecção humana. Neste modelo, antígenos do parasito interagem com células dendríticas (CD) e polarizam para uma resposta do tipo Th1 (revisado por Silveira *et al.*, 2009). Nesta infecção, a imunopatologia pode variar de acordo com a resposta inflamatória. No caso da LMC, níveis elevados de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e baixos de IL-10 podem ser observados. Por outro lado, na LC níveis elevados de TNF- $\alpha$  e IL-10 e baixos de IL-12 e IFN- $\gamma$  são detectados (WHO, 2010).

Neste projeto, também avaliamos o papel de componentes da resposta imune inata frente à estimulação por LPGs de espécies do Novo Mundo. Estudos *in vivo*, utilizando espécies de *Leishmania* do Velho Mundo, demonstraram a importância de parasitos e LPGs com TLRs e outros componentes do sistema imune inato em experimentos com camundongos e células humanas. De Veer *et al.* (2003) e Becker *et al.* (2003) demonstraram que o LPG é um importante agonista de TLR2 induzindo a produção de citocinas em macrófagos e células NK, respectivamente. Em adição, estudos com RNA de interferência demonstraram que TLR2 e TLR3 estão envolvidos no reconhecimento do LPG de *L. donovani* em macrófagos primados com IFN- $\gamma$  (Flandin *et al.*, 2006). Em *L. major*, camundongos deficientes para TLR4 são mais susceptíveis à infecção resolvendo de maneira menos eficaz as lesões (Kropf *et al.*, 2004).



Vários trabalhos tem demonstrado o papel de TLRs em *Leishmania* incluindo TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 além da molécula adaptora MyD88 (revisado Tuon *et al.*, 2008). Para investigar o possível papel dos TLR2 e TLR4 na sinalização por LPG de espécies do Novo Mundo, macrófagos peritoneais provenientes destes camundongos *knockout* foram utilizados. Conforme o perfil de NO e citocinas observamos de maneira geral um papel preponderante de TLR4 seguido por TLR2 em macrófagos ativadas por LPGs. Em relação à síntese de NO por parasitos vivos de ambas as espécies, este mediador foi produzido de maneira mais eficiente nos camundongos C57BL/6, TLR2 (-/-) e TLR4 (-/-), demonstrando que outros TLRs poderiam ter sido ativados por outras moléculas do parasito. Porém, esta ativação não foi estatisticamente diferente entre os grupos (ANOVA,  $P > 0,05$ ). Entretanto, estes camundongos produziram mais NO do que os da linhagem BALB/C, e isto poderia ser resultado de seu padrão de resistência/susceptibilidade (Sacks e Noben-Trauth, 2002). Ao contrário do observado para NO, após exposição aos LPGs de ambas as espécies, a produção de TNF- $\alpha$  foi bem menor nos camundongos TLR2/4 (-/-) do que nos selvagens (C57BL/6), resultado esperado uma vez que estes receptores estarem ausentes nestes animais e são determinantes para a indução da síntese desta citocina.

A participação de TLR4 no reconhecimento do LPG pôde também ser observada pela produção de NO e de algumas citocinas neste trabalho. Uma primeira hipótese seria de que nossas preparações poderiam ter traços de LPS. Porém, nossos resultados anteriores com LPG de *L. infantum* realizados em presença de Poliximina B (Coelho-Finamore *et al.*, 2011) e com GIPLs das duas espécies (Assis *et al.*, 2012b) não detectaram contaminação com esta toxina, garantindo a pureza de nossas soluções durante nossos procedimentos. Além disso, em nossos experimentos as citocinas IL-10 e IL-12 e os camundongos TLR2 (-/-) para TNF- $\alpha$  não foram também ativados por nossas amostras contendo LPG, em concentração 100 vezes mais alta do que a utilizada para LPS (10  $\mu\text{g/mL}$  X 100  $\text{ng/mL}$ ). Esses resultados são diferentes dos observados para as espécies do Velho Mundo (de Veer *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2003) e *L. amazonensis* (Vivarini *et al.*, 2011) que demonstraram que o LPG é reconhecido por TLR2.

Do que foi exposto, é possível observar que os experimentos *in vitro* têm demonstrado o papel de TLR2 e TLR4 para as diferentes espécies de *Leishmania* tanto do Novo quanto Velho Mundo. Porém, os estudos *in vivo*, tem mostrado além destes receptores o papel de TLR3 e TLR9 no controle da infecção, sendo estes resultados consistentes com a presença de outros agonistas quando observada a integridade do parasito.

Estudos anteriores com LPG de *L. major* e mais recentes com GIPLs de *L. infantum* e *L. braziliensis* observaram que estes glicoconjugados eram capazes de inibir a produção de

nitrito em macrófagos quando expostos previamente a LPS ou IFN- $\gamma$  (Proudfoot *et al.*, 1996; Assis *et al.*, 2002b). Assim, para testar um possível papel dos nossos LPGs na inibição da produção de NO, macrófagos foram incubados com estas moléculas e em seguida, estimulados com LPS. Consistente com observações anteriores foi observada uma inibição significativa na produção de NO induzido por LPS. Apesar de preliminares, esses resultados indicam que o LPG pode modular a síntese de NO, sendo um importante mecanismo de escape utilizado pelo parasito.

Tendo em vista que nossos LPGs foram capazes de ativar TLRs, nosso interesse foi dirigido aos eventos intracelulares após esta estimulação. Além da via de MyD88, a sinalização por TLRs também ativa a via de sinalização de MAPKs, com consequente recrutamento de fatores de transcrição nuclear e produção de citocinas (Takeda *et al.*, 2002).

Com o intuito de avaliar a modulação da ativação de MAPKs, estas foram avaliadas pela presença das formas di-fosforiladas de ERK e p38. Estudos recentes utilizando GIPLs destas duas espécies não foram capazes de ativar estas MAPKs (Assis *et al.*, 2012b), demonstrando que os GIPLs são potentes inibidores destas cinases. É interessante notar nos nossos experimentos, este perfil foi completamente diferente após estimulação com LPGs. Não foi detectada a ativação de ERK pelo LPG de *L. Infantum* ao contrário do LPG de *L. braziliensis* no qual foi detectada uma ativação máxima com 15 minutos. No caso de p38, ambos os LPGs foram capazes de ativá-la após 5 minutos, sendo que esta ativação foi gradual para *L. infantum* e pontual para *L. braziliensis*. A ativação de p38 é importante para o controle da infecção por *Leishmania* e a taxa de sobrevivência do parasito diminui em indivíduos tratados com anisomicina, potente ativador desta MAPK (Junghae e Raynes, 2002). A diferença entre o perfil de ativação de p38 pelos dois LPGs pode em parte explicar a diferença no perfil de produção de NO, em macrófagos BALB/c e C57BL/6, de TNF- $\alpha$ , apenas para BALB/c (Balaraman *et al.*; 2005; Privé e Descoteaux, 2000). Estudos pioneiros de Feng *et al.* (1999) utilizando LPS demonstraram um papel importante destas MAPK (e também ERK) na indução de NO e TNF- $\alpha$ . Nossos resultados demonstram que isto pode também ser importante para o caso de LPGs de *Leishmania*. Em relação à ERK, os estudos com esta MAPK durante a interação com *Leishmania* ou moléculas derivadas são controversos na literatura e englobam principalmente as espécies do Velho Mundo (revisado por Olivier *et al.*, 2005). Em nosso trabalho, ERK não foi ativada por *L. infantum*, e este resultado é consistente com a ausência da produção de IL-12 durante a infecção por esta espécie *in vivo* (WHO, 2010). Em adição, trabalhos *in vitro* demonstraram a importância da ativação de ERK na indução de IL-12 (Balaraman *et al.*; 2005). Por outro lado, esta MAPK foi ativada de forma

bastante transiente pelo LPG de *L. braziliensis*, estímulo talvez não suficiente para se detectar *in vitro* níveis consideráveis de IL-12.

Em última análise, este trabalho demonstrou um perfil diferente de produção/ativação de NO, citocinas e MAPKs pelos LPGs de *L. braziliensis* e *L. infantum*. Em macrófagos observou-se que a indução de NO foi dose-dependente e mais acentuada para o LPG de *L. braziliensis*. Este perfil se repetiu para as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Ambos LPGs foram capazes de inibir a produção de NO em macrófagos estimulados com LPS. Em conjunto, esses resultados demonstram que o LPG de *L. braziliensis* apresenta uma tendência mais pró-inflamatória do que o LPG de *L. infantum*, correlacionando com níveis mais elevados de NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Em adição, os resultados encontrados sugerem uma participação pronunciada de TLR4, e em menor grau de TLR2. Esses resultados, juntamente com outros trabalhos já publicados, sugerem que o LPG pode estar envolvido nas interações com macrófagos induzindo e modulando extra e intracelularmente o sistema imune do hospedeiro. Assim, o polimorfismo observado entre os LPGs de *L. braziliensis* e *L. infantum* pode ser responsável pela ativação diferencial dos macrófagos resultando em manifestações clínicas distintas causadas. Juntos, estes dados levam a crer que o LPG presente na superfície das *Leishmania*, pode ter um papel importante nos eventos iniciais do sistema imune inato, podendo direcionar para o futuro sucesso da infecção e aspectos imunopatológicos posteriores. O entendimento destes mecanismos poderá ajudar no desenvolvimento de métodos alternativos de controle para as Leishmanioses tanto do Velho quanto Novo Mundo.

## 7 Conclusões

Os LPGs de *L. braziliensis* e *L. infantum* ativaram a produção de NO em camundongos primados de forma dose dependente;

Macrófagos estimulados por LPG de *L. braziliensis* apresentaram um perfil mais pró-inflamatório que os macrófagos estimulados com LPG de *L. infantum*, correlacionando com maior produção de NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6;

A produção diferencial de citocinas e NO observada entre os camundongos selvagens e knockouts, sugere uma participação preferencial de TLR4, e em menor grau de TLR2, nas vias de reconhecimento do LPG;

A pré-incubação com LPGs de ambas as espécies inibiu a produção de NO em macrófagos estimulados posteriormente com LPS;

A cinética de ativação de p38 apresentou um perfil gradual para *L. infantum*, enquanto que para *L. braziliensis* essa ativação foi pontual;

Ao contrário do que foi observado para *L. braziliensis*, o LPG de *L. infantum* não foi capaz de ativar ERK.

## 8 Publicações em colaboração durante o mestrado

Assis RR, Ibraim IC, Nogueira PM, Soares RP, Turco SJ. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochim Biophys Acta*. 2012 (in press)

Assis RR, Ibraim IC, Noronha FS, Turco SJ, Soares RP. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6 (2): e1543.



## Review

## Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts<sup>☆</sup>

Rafael Ramiro de Assis<sup>a</sup>, Izabela Coimbra Ibraim<sup>a</sup>, Paula Monalisa Nogueira<sup>a</sup>, Rodrigo Pedro Soares<sup>a</sup>, Salvatore J. Turco<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte, MG 30190-002, Brazil  
<sup>b</sup> Department of Biochemistry, University of Kentucky Medical Center, 741 South Limestone, Lexington, KY 40536, USA

## ARTICLE INFO

**Article history:**  
 Received 22 September 2011  
 Received in revised form 31 October 2011  
 Accepted 1 November 2011  
 Available online xxxxx

**Keywords:**  
 Leishmania  
 New World  
 Lipophosphoglycan  
 Glycoinositolphospholipids  
 Host-parasite interaction

## ABSTRACT

**Background:** Protozoan parasites of the genus *Leishmania* cause a number of important diseases in humans and undergo a complex life cycle, alternating between a sand fly vector and vertebrate hosts. The parasites have a remarkable capacity to avoid destruction in which surface molecules are determinant for survival. Amongst the many surface molecules of *Leishmania*, the glycoconjugates are known to play a central role in host-parasite interactions and are the focus of this review.

**Scope of the review:** The most abundant and best studied glycoconjugates are the lipophosphoglycans (LPGs) and glycoinositolphospholipids (GIPs). This review summarizes the main studies on structure and biological functions of these molecules in New World *Leishmania* species.

**Major conclusions:** LPG and GIPs are complex molecules that display inter- and intraspecies polymorphisms. They are key elements for survival inside the vector and to modulate the vertebrate immune response during infection.

**General significance:** Most of the studies on glycoconjugates focused on Old World *Leishmania* species. Here, it is reported some of the studies involving New World species and their biological significance on host-parasite interaction. This article is part of a Special Issue entitled Glycoproteomics.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Leishmaniasis

Leishmaniasis is an infectious disease that afflicts millions of people worldwide caused by parasites of the genus *Leishmania*. In accordance with the species involved and the immunological status of the host, this disease exhibits a spectrum of clinical manifestations: cutaneous (CL), mucocutaneous (ML), and visceral leishmaniasis (VL), also known as kala-azar [1].

**Abbreviations:** CL, cutaneous leishmaniasis; ML, mucocutaneous leishmaniasis; DCL, diffuse cutaneous leishmaniasis; VL, visceral leishmaniasis; GPI, glycosylphosphatidylinositol; LPG, lipophosphoglycan; GIPs, Glycoinositolphospholipids; SAP, secreted acid phosphatase; sPPGs, secreted protelipophosphoglycans; PSC, promastigote secretory gel; TLR, toll-like receptors; MyD88, Myeloid differentiation primary response gene 88; PKC, protein kinase C; iNOS, inducible nitric oxide synthase; NO, nitric oxide; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; IFN, interferon; IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharide; MAPKs, mitogen-activated protein kinases; ERK, extracellular-signal-regulated kinases; PKR, protein kinase R; PTK, protein-tyrosine kinases; Man, mannose; Gal, galactose; Gal, galactose; Gal<sub>6</sub>, galactofuranose; PO<sub>4</sub>, phosphate; GalNAc, N-acetyl-galactosamine; DC, dendritic cell; NK, natural killer cell; PAMPs, pathogen associated molecular patterns; NETs, neutrophil extracellular traps

<sup>☆</sup> This article is part of a Special Issue entitled Glycoproteomics.

\* Corresponding author. Fax: +1 859 257 1804.

E-mail address: turco@email.uky.edu (S.J. Turco).

0304-4165/\$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.  
 doi:10.1016/j.bbagen.2011.11.001

Please cite this article as: R.R. de Assis, et al., Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts, *Biochim. Biophys. Acta* (2011), doi:10.1016/j.bbagen.2011.11.001

The most common syndrome form is CL, characterized by ulcerative skin lesions generally self-heal that develop at the site of the bite of the sand fly. CL is most frequently caused by *Leishmania major*, *Leishmania aethiopia* and *Leishmania tropica* in the Old World and by *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania peruviana*, *Leishmania mexicana* and related species in the New World America [2].

A variant form of cutaneous leishmaniasis, called mucocutaneous leishmaniasis (ML), is caused by *L. braziliensis*, which has a tropism for macrophages of the oronasopharyngeal region and produces a mucosal granuloma that eventually destroys the nose and mouth. *L. panamensis*, *L. guyanensis* and *Leishmania amazonensis* have also been associated with ML [3,4]. Another type of CL is diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), caused by *L. amazonensis*. It is characterized by a chronic, progressive, polyparasitic variant and is manifested by disseminated non-ulcerative skin lesions [1].

Finally, VL is a human systemic disease and represents the most severe clinical manifestation of *Leishmania* infection. *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) in the Old and New World are the species that are implicated in this disease [5]. The parasite disseminates and infects macrophages of the liver, the spleen and the bone marrow and may be fatal when untreated [6].

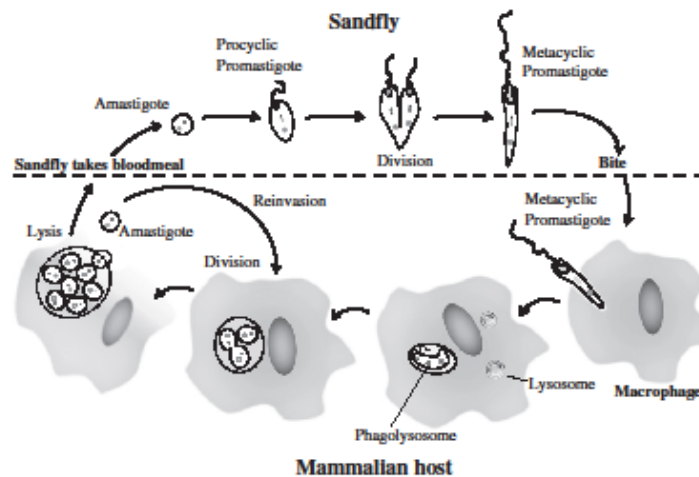


Fig. 1. Life cycle of *Leishmania* parasites. Inside the vector insect, *Leishmania* varies from replicative procyclic promastigotes that, through the metacyclogenetic cycle, differentiate into the infective metacyclic promastigote that is injected into the vertebrate host when the insect takes a blood meal. Inside the vertebrate host, the parasite is phagocytized, mainly by macrophils, macrophages and dendritic cells where they differentiate into the amastigote form. The amastigotes can either live or die in cells, or be ingested by another phlebotomine in the blood meal.

The genus *Leishmania* is sub-divided into two subgenus according to the behavior in the sand fly gut. In the subgenus *Leishmania*, the parasites are mainly found in the midgut and foregut, whereas in the subgenus *Vivax* they are attached to the hindgut prior to migration to anterior parts [7].

## 2. The life cycle of *Leishmania*

The parasites have a notable capacity to avoid destruction in the hostile environments encountered in their life cycle, alternating between two stages: flagellated promastigotes in the digestive tract of the sand fly vectors and non-motile amastigotes that proliferate within macrophages of the mammalian host. Promastigotes can be further classified as procyclic promastigotes, which multiply in the gut of the sandfly, or as the infective non-dividing metacyclic promastigotes, which detach from the gut epithelial cells and migrate towards the anterior end of the digestive tract [8]. Transmission of the parasite in the mammalian host occurs during the bite of sand fly vector, of either

the genus *Phlebotomus* (Old World) or the genus *Lutzomyia* (New World) [9] (Fig. 1).

## 3. Major *Leishmania* glycoconjugates

### 3.1. Overview

To survive successfully and multiply within these two hostile environments, the parasites must undergo profound biochemical and morphological adaptations, including the expression of glycoconjugates composed largely of molecules attached by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors [10]. GPI molecules are typically considered as anchors of surface molecules such as proteins [11,12] present in most if not all eukaryotes. In *Leishmania*, however, these GPI-anchored molecules include lipophosphoglycan (LPG), glycoinositolphospholipids (GIPs), glycoproteins 63 (gp63) and the proteophosphoglycan (PPG), or they are secreted as protein-containing phosphoglycans (PGs), including the secreted proteophosphoglycan (sPPG) and a secreted acid phosphatase (sAP) [13]. In

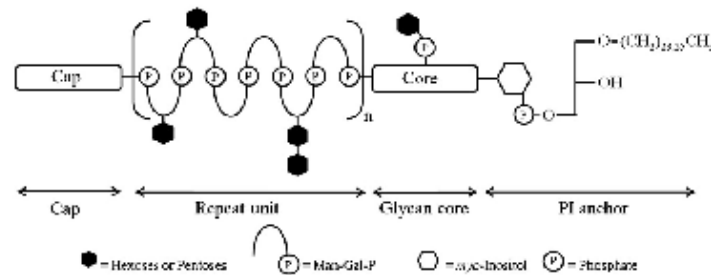


Fig. 2. Structure of LPG. The LPG has four domains, the phosphatidylinositol-linked lyso-alkylglycerol lipid anchor, the conserved glycan core, the repeat units and the cap. The structure and number of phosphoglycan repeat units vary and depend on the stage of differentiation and the species of *Leishmania*. Gal, galactose; Man, mannose; Core, hexasaccharide glycan core; Cap, neutral oligosaccharide.

Please cite this article as: R.R. de Assis, et al., Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts, *Biochim. Biophys. Acta* (2011), doi:10.1016/j.bbaga.2011.11.001

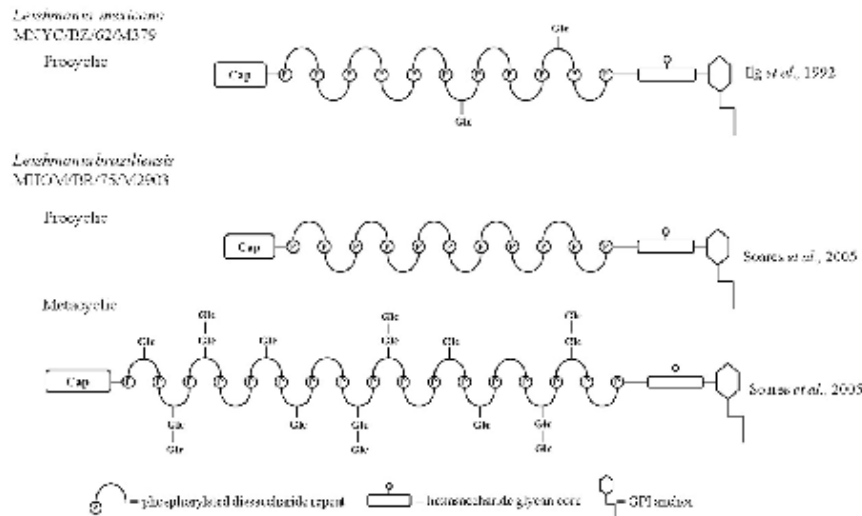


Fig. 3. Schematic diagram of LPG from procyclic and metacyclic *L. braziliensis* and procyclic *L. mexicana*. During metacyclogenesis, the LPG can increase in number of repeating units and the nature of side chain substitutions. In *L. braziliensis*, 1–2 glucose residues are added after metacyclogenesis. The metacyclic structure of *L. mexicana* LPG has not been characterized yet [31,34].

this review, we will focus on LPG and GPIs on New World species of *Leishmania*. For information on gp63 see references [14–17].

### 3.2. Interspecies and intraspecies variation in Lipophosphoglycan

The most studied surface glycoconjugate is LPG, which forms a dense glycolyx covering the entire surface of the parasite and the flagellum [10]. LPG is predominantly expressed in promastigotes and is virtually absent in the intracellular amastigotes [18–20]. LPG has been biochemically characterized and polymorphisms in its structure are critical in the specificity of *Leishmania* to different vectors. The recognition of binding sites in the epithelium by the LPG is a crucial step preventing loss of the parasite during the excretion of the digested blood meal [21,22]. During the differentiation process of metacyclogenesis, LPG undergoes crucial changes in structure (discussed below) [23]. Understanding variations and the LPG structures are crucial for the comprehension of the mechanisms of how parasites survive under extremely adverse conditions.

In *Leishmania*, the basic LPG structure consists of four domains (Fig. 2): (1) a lipid anchor characterized by a 1-O-alkyl-2-lyso-phosphatidylinositol containing either C24 or C26 as the aliphatic substituent, (2) a glycan core, consisting of the structure Gal(α1,6)Gal(α1,3)Gal(β1,3)[Glc(α1)-PO<sub>4</sub>Man(α1,3)Man(α1,4)-GlcN(α1)], (3) a backbone repeat units [Gal(β1,4)Man(α1)-PO<sub>4</sub>], and (4) an oligosaccharide cap structure [10,24]. Structural analysis of LPG from different species revealed complete conservation of the lipid anchor and the glycan core. The polymorphisms among *Leishmania* species are in the sugar composition and sequence of branching sugars attached to the repeat units and in the cap structure [25].

The pioneering studies involving LPG characterization included mainly Old World Species such as *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica* and *L. aethiops* [26–30]. In contrast, many aspects on the glycobiology in New World *Leishmania* are still unknown. The first LPG characterized in a New World species was from *L. mexicana* procyclic promastigotes, where the C3 hydroxyl of the repeat unit galactose is partially

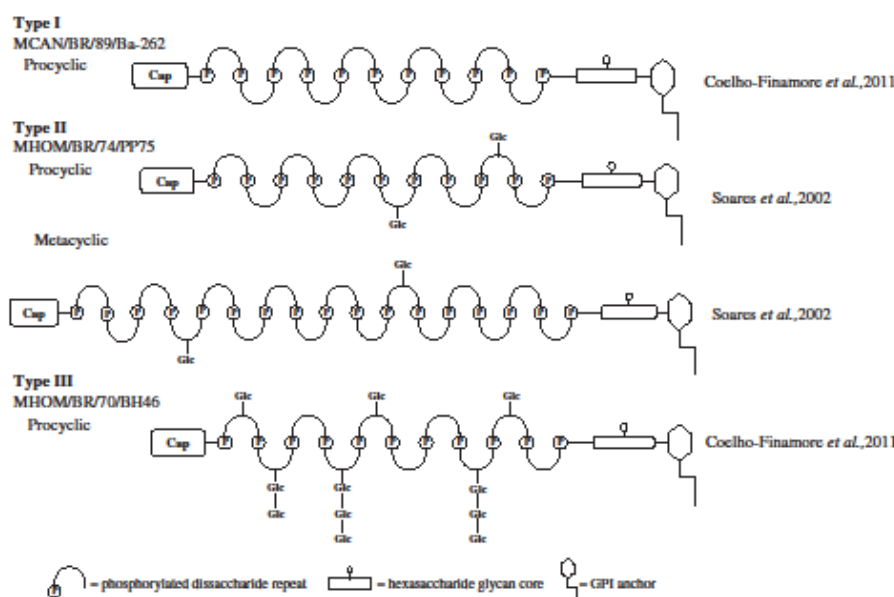
substituted with β-Glc residues in approximately 20% of the repeat units [31] (Fig. 3). This species exhibits three types of terminally mannosylated caps including Manα1-2Man, Manα1-2Manα1-2Man or Manα1-2(Galβ1-4)Man. For this species, the structure of metacyclic promastigotes LPG is still unknown so that there is no evidence that it changes during metacyclogenesis. However, a large number of studies have looked at the interaction between this species and the vector *L. longipalpis* that will be described in the next chapter.

Ten years later after the description of *L. mexicana* LPG, the LPG of *L. infantum* (strain PP75) was characterized [32] (Fig. 4). Similar to *L. mexicana*, it also possesses β-glucose residues in approximately 1/3 of the repeat units. The expression of these glucose residues are down-regulated in the metacyclic stage after metacyclogenesis. Differently from *L. mexicana*, *L. infantum* caps are terminally galactosylated and glucosylated, represented by Gal(β1,4)Man with lesser amounts of the trisaccharide Glc(β1,3)Gal(β1,4)Man, respectively. The expression of β-Glc residues in both the caps and the side chains of LPG were suggestive of being determinant for the binding to *L. longipalpis* midguts. The number of repeat units in procyclic and metacyclic LPG was determined using capillary electrophoresis (CE). The repeat unit numbers were 19 and 34 for procyclic and metacyclic LPGs, respectively [33]. In conclusion, similar to Old World species, *L. infantum* LPG also increases in size after metacyclogenesis due to an approximate doubling in the number of repeat units.

Following the description of *L. infantum* LPG, the first LPG structure from a Vianna species was provided [34] (Fig. 3). In *L. braziliensis* LPG, a different mechanism in the carbohydrate regulation in the LPG side-chains was observed. The *L. (V.) braziliensis* LPG from the procyclic form is similar to the *L. donovani* (Sudan), being devoid of side chains that branch off the Gal-Man-P disaccharide backbone [29], while in the metacyclic stage it contains one or two β-Glc residues as side chains. This up-regulation is the opposite that is observed for some species belonging to the subgenus *Leishmania*. For example, in *L. donovani* (India) [26] and *L. infantum* (Brazil) [32], down-regulation of β-Glc residues occur during differentiation into metacyclics. The caps

Please cite this article as: R.R. de Assis, et al., Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycosylphospholipids and interaction with hosts, *Biochim. Biophys. Acta* (2011), doi:10.1016/j.bbagen.2011.11.001





**Fig. 4.** Schematic diagram of different types of LPG (I, II and III) from New World *Leishmania infantum* strains. The main difference observed on the repeating units from *L. infantum* strains is the degree of  $\beta(1,3)$  glycosylation that categorizes these LPGs into three classes: Type-I LPGs with no side chain substitutions; Type-II LPGs with one glucose side chain substitutions on the repeating units and Type-III LPGs with two or more glucose side chain substitutions [32,35].

of *L. braziliensis* were not fully elucidated, but qualitative analysis of monosaccharides using CE indicated the presence of mannose, glucose and galactose (3:1:3) [34].

An unknown aspect of the glycobiology not only in the New World, but also in Old World species, was the level of intraspecies polymorphisms in the LPG structures. Recently, the repeat units of 16 *L. infantum* strains from Brazil, Africa and Europe were evaluated. The results indicated that intraspecies polymorphism in *L. infantum* LPG is very low and most of the strains (~90%) are devoid of side chains. One strain (PP75) had a  $\beta$ -Glc substitution in the side-chains, whereas strain BH46 had up to three glucose side chains.

**Table 1**  
Studies on LPGs and GPIs from New and Old World *Leishmania* species

Glycoconjugate	Refs.
<b>Lipophosphoglycan</b>	
<i>L. donovani</i>	[18,29,155]
<i>L. major</i>	[19,27,28,156]
<i>L. tropica</i>	[28,30]
<i>L. aestivipica</i>	[28]
<i>L. mexicana</i>	[31]
<i>L. infantum</i>	[32,35]
<i>L. braziliensis</i>	[34]
<b>Glycosylated phospholipid</b>	
<i>L. donovani</i>	[18]
<i>L. major</i>	[139,140]
<i>L. aestivipica</i>	[142]
<i>L. tropica</i>	[142]
<i>L. mexicana</i>	[141,157]
<i>L. panamensis</i>	[136]
<i>L. infantum</i> and <i>L. braziliensis</i>	[154]

Please cite this article as: R.R. de Assis, et al., Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycosylated phospholipids and interaction with hosts, *Biochim. Biophys. Acta* (2011), doi:10.1016/j.bbaga.2011.11.001

The latter was the first reported example of a poly-glycosylated LPG [35] (Fig. 4). LPG and GPIs structures described are represented in Table 1.

### 3.3. Interaction with the sand fly

It has been postulated that inter- and perhaps intraspecies-specific polymorphisms in the phosphoglycan domains of LPG might be crucial for *Leishmania* specificity to a given vector [9,21,22,36]. Many studies have addressed this issue which has led to the intense discussion of permissive and specific vectors. Although some vectors may be infected and sustain infection by different *Leishmania* species, some results have been controversial regarding the role of LPG in this process. For example, *L. major* can only infect and sustain infection in *Phlebotomus papatasi* [22]. On the other hand, many species can interact with different sand fly midguts and even *L. mexicana* LPG-deficient mutants could sustain infection in permissive vectors [37]. More importantly, some conclusions were derived from the in vitro model, which has limitations as recently demonstrated [38] and many challenges and questions still remain to be elucidated [39].

The first study using the in vitro binding system in *L. longipalpis* and *L. infantum* showed similar results to Old World species *L. donovani* and *L. major*. Differently from metacyclic PGs where the lipid anchor was removed by phospholipase C treatment, procyclic PGs were able to attach and inhibit parasite adhesion [32]. In spite of having a strong evidence for the existence of a midgut receptor, no available information exists for this fly receptor in *L. longipalpis*. Only for *L. major*, a galectin receptor has been found in the midgut of *P. papatasi* [40]. Four galectins (A–D) have been reported in the transcriptome of *L. longipalpis* [41] and their role as putative ligands for LPG and parasite binding should be explored. Since this species is thought to be very permissive [42], it is still

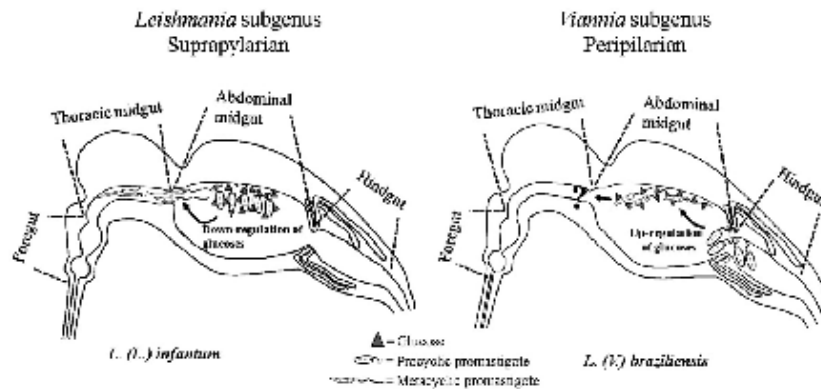


Fig. 5. The different developmental patterns of *Leishmania* within the sand fly gut. The *Leishmania* subgenera confine their development to the midgut and foregut of their sand fly vectors. In the subgenus *Leishmania*, parasites are attached to the midgut through LPG. In *L. (L.) infantum* (strain PPT5), after metacyclogenesis, the down-regulation of  $\beta$ -glucosidase enables its detachment and migration to anterior parts. In the case of the members of the *Vivax* subgenus, such as *L. (V.) braziliensis*, parasites are also seen attached to the hindgut lining by flagellar hemidesmosomes. An up-regulation of glucosidase occurs during their migration to the midgut. However, how the detachment occurs prior to migration to the foregut is a missing step in this species [32,34,46].

unknown if the existence of a receptor could be similar as that observed for *P. papatasi*. It was demonstrated that LPG-independent mechanisms may exist in permissive sandflies such as glycoproteins bearing N-acetylgalactosamine (GalNAc) residues in the midgut of *Phlebotomus arabicus* [43]. In this work, *lpg1*-mutants (unable to synthesize LPG) of *L. major* were able to sustain infection in this permissive vector and *L. longipalpis*. However, those combinations are not the ones occurring in nature, but the development of *L. infantum* mutants could help to solve this gap involving the permissiveness of *L. longipalpis*. Another interesting example is the finding of *L. major/L. infantum* hybrids. Those hybrids expressed mostly *L. major* LPG, which enabled their infection in *P. papatasi*. Although both species could survive separately in the permissive *L. longipalpis*, *L. infantum* was not able to survive in *P. papatasi* [44]. It was recently demonstrated the occurrence of intraspecific polymorphism in *L. infantum* LPG. The biological role of the three types of LPG (I, II and III) was studied during the interaction with the vector *L. longipalpis*. All strains could successfully sustain infection in this vector demonstrating no apparent effect of LPG polymorphism in this process. Even the strain from Portugal (IPT1) developed very well in *L. longipalpis*; consistent with the idea that introduction of *L. infantum* in the Americas was made possible by the presence of this permissive vector [43].

Only two studies have addressed the presence of midgut binding sites for *L. braziliensis* in its sand fly vectors. This species belongs to the subgenus *Vivax* [7], known to start its development in the pyloric triangle prior to anterior migration to mouth parts (Fig. 5). In this sense, heparin binding proteins (HBPs) from *L. braziliensis* promastigotes were able to recognize proteins extracted from the midguts of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani*. This class of proteins was suggested to have importance during the interaction with the invertebrate host but inhibition assays were not performed to confirm this idea [45]. On the other hand, using the *in vitro* binding model, not only PGs form procyclic but also metacyclic parasites were able to bind and inhibit parasite adhesion in the midguts of *L. intermedia* and *L. whitmani*. This may suggest that PGs are necessary not only for attachment, but also for their migration towards the insect's mouth parts [46]. The unusual pattern of attachment by metacyclic PG in this species might be a result of its peripylarian behavior and should be more explored. A missing step in this interaction is how metacyclic parasites could detach. A "second" metacyclic stage has been suggested [36,46] and a model is proposed (Fig. 5).

### 3.4. Secreted glycoconjugates (sAPs and PPGs)

All species of *Leishmania*, except *L. major*, abundantly secrete acid phosphatases (sAPs). These highly glycosylated proteins are released by promastigotes not only in their life cycle in the sand fly but also under axenic culture conditions. Similar to LPG, they are very polymorphic and also increase in size due to changes in phosphoglycosylation during *Leishmania* metacyclogenesis. They can be found in monomers or polymers depending on the species. The sAP of *L. donovani* is secreted as monomers and oligomers of the phosphoglycoprotein, whereas in *L. mexicana*, *L. braziliensis* and *L. amazonensis*, sAP consists of extended filaments that contain multiple units [47–52]. The sAP structure in *L. infantum* is not known, but it does not seem to increase in size after metacyclogenesis [32].

More recently, the role of other glycoconjugates such as secreted proteophosphoglycans (sPPGs) have been studied using the model *L. infantum* and *L. mexicana* in *L. longipalpis* shedding new light on the mechanisms of parasite transmission during the bite of the sand fly. This glycoconjugate is part of the promastigote secretory gel (PSG) that blocks the anterior part of the sand fly gut and is released during the bite having important consequences on parasite transmission and establishment in the skin of the mammalian host [53–56].

### 3.5. Glycoconjugates in vertebrate host–*Leishmania* interactions

#### 3.5.1. Overview

*Leishmaniasis* comprises a wide spectrum of clinical manifestations depending on the species involved. However, it is not known to what extent variations in surface glycoconjugates may drive polarization of TH1/TH2 responses and determine the outcome and immunopathology of the disease.

LPG is crucial not only for the interaction with the invertebrate host as reviewed above, but also for the early steps during establishment of the infection. In *L. major*, after internalization and differentiation into amastigotes within the parasitophorous vacuoles within macrophages, LPG expression is significantly reduced with greater expression of proteophosphoglycans (PPGs) [57] which share common glycan features with LPG. Another class of related glycoconjugates is the glycosylated phospholipids (GIPLs), which are present either in promastigotes or amastigotes, the replicating form during the course of infection in the vertebrate host.

Please cite this article as: R.R. de Assis, et al., Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycosylated phospholipids and interaction with hosts, *Biochim. Biophys. Acta* (2011), doi:10.1016/j.bbagen.2011.11.001

In general, LPGs from either New or Old *Leishmania* species have been reported to participate in a variety of processes during the establishment of infection in the vertebrate host. These processes include: resistance to the lytic action of the complement system, attachment and entry into macrophages, protection from proteolytic damage within acidic vacuoles [58], inhibition of phagosomal maturation [59], modulation of nitric oxide (NO) and IL-12 production [60–62], inhibition of protein kinase C [63], induction of neutrophil extracellular traps (NETs) [64] and induction of protein kinase R (PKR) [66].

Upon inoculation by the sand fly in the host skin, several cellular and molecular events take place in the site of the bite. Cellular components of the innate immune system are determinant during early steps of infection not only in *Leishmania* but also in other Protozoa. Dendritic cells (DC), natural killer (NK), neutrophils and macrophages are some of the key elements attracted in response to the parasite. The activation of those cells is essential for the development of polarized Th1 lymphocytes and the establishment of a solid acquired cell-mediated immunity. The ability of the cellular innate immune compartment in orchestrating an initial effective immune response will be important during subsequent steps of infection, such as chronic re-infection and immunopathology [67].

The mechanisms underlying the ability of *Leishmania* to circumvent the host defenses to get access and multiply intracellularly are surprisingly complex and diverse. The infection outcome depends not only on the species and virulence of the parasite but also on the macrophage subpopulation and their state of activation. *Leishmania* parasites are able to recognize and gain access inside the macrophage through several phagocytic receptors including mannose-fucose receptor (MFR) [68–70], complement receptors CR1 and CR3 [71,72] and also exploiting Fc receptor [73,74]. The most common pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) in *Leishmania* are LPG and GPIs. They are recognized by toll-like receptors (TLRs) by different cell types, interfering with signaling transduction pathways [75–78]. Some of those survival strategies will be discussed here and in the next sections.

### 3.5.2. LPG interaction with cellular components

The evidence that LPG is a multivirulence factor was based primarily on *in vitro* studies using the purified molecule. Some studies have demonstrated its importance and diversity during the host response to *Leishmania* species. Old World species such as *L. major* LPG mutants fail to infect and sustain infection in macrophages, whereas in *L. mexicana* the parasites could develop normally [79–81].

It has been shown for *L. major* that neutrophils are the first line defense against infection arriving at the site of infection before inflammatory macrophages, the primary targets for parasite replication [82]. The importance of *Leishmania* LPG interaction with neutrophils has been also demonstrated on *L. donovani* *lpg1*( $-/-$ ) and *lpg2*( $-/-$ ) gene mutants. It was demonstrated that LPG drives the persistence of the parasite on tight, non-lytic, compartments inside neutrophils, and both mutants lacking LPG were unable to prevent the fusion of the phagosome with lysosomes and the formation of a lytic environment, followed by parasite killing [83].

In *L. amazonensis*, the role of neutrophils in the initial steps of infection has been recently demonstrated using a phagocytosis-independent killing mechanism mediated by neutrophil extracellular traps (NETs). Those structures are webs composed by chromatin and granular proteins having microbicidal effect against pathogens including fungi and bacteria [84]. Not only the parasites, but also purified *L. amazonensis* LPG, were able to induce NETosis in a cell- and dose-dependent manner [64]. On the other hand, the Old World species *L. donovani* seems to induce NETosis independently from the presence of LPG and *gp63*, also LPG knockout mutants display an enhanced susceptibility to NETs dependent killing, which indicates a protective role of LPG on this species [85].

### 3.5.3. Inhibition of phagosome-endosome fusion and oxidative burst by LPG

Most of the studies of phagosome maturation are restricted to Old World species of *Leishmania*. In general, at the onset of infection, promastigotes of *Leishmania* are internalized by macrophages into phagosomes, also named parasitophorous vacuoles. These structures undergo a sequential series of fusions with endocytic organelles and lysosomes generating a potent microbicidal compartment. *Leishmania* promastigotes developed strategies to survive intracellularly in the lytic environment of phagolysosomes [59,86]. It was demonstrated that LPG inhibits phagolysosomal biogenesis, thus protecting invading promastigotes from hydrolytic degradation and providing an environment propitious for their differentiation into amastigotes [86]. Furthermore, there is evidence that phagosomes containing *Leishmania* promastigotes display low fusogenic properties toward endocytic organelles. Also vacuoles formed around *L. donovani* *lpg*-defective mutants promote, during the early phase of macrophage infection, complete destruction of the parasite caused by extensive endosomes and lysosomes fusion [59]. Russell et al. [87] have shown that phagosome-endosome fusion can be restored in phagosomes containing *L. mexicana* by a down-regulation of LPG expression, facilitating transformation of promastigotes into amastigotes.

The molecular mechanisms by which LPG inhibits phagosome-endosome fusion in New World species are still poorly understood. Many reports have evaluated the role of protein kinase C  $\alpha$  (PKC $\alpha$ ), one of the components involved in the process of *L. donovani* infections. PKC $\alpha$  is associated with the phagosomal membrane and phosphorylates the myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS), a membrane protein associated with actin-based motility and with membrane trafficking. This pathway leads to the movement of both lysosomes and phagosomes on microtubules [88,89]. In macrophages, the inhibition of PKC $\alpha$  by *L. donovani* LPG leads to the inhibition of F-actin depolymerization at the phagosomal membrane, avoiding the fusion events for the delivery of endosomal contents into the parasitophorous vacuoles [90,91].

The inhibition of PKC $\alpha$  by LPG was also observed in *L. mexicana*. Interestingly, *L. mexicana* LPG was able to inhibit PKC $\alpha$  activation in susceptible BALB/c mice but not on the resistant C57BL/6 mice. This was also accompanied by oxidative burst inhibition on BALB/c mice and not on C57BL6 [92].

In addition to phagosome-endosome fusion inhibition, it has been shown that LPG is able to insert into the surface of the lipid bilayer after internalization of promastigotes [93,94]. By inserting into the membrane lipid bilayer, the LPG modifies its physical organization and disrupts specialized membrane microdomains (lipid rafts) and normal fusogenic properties. This dose interaction with the cellular membrane causes a reduction of promastigote phagocytosis, oxidative burst inhibition by preventing the assembly of the NADPH oxidase complex, normal cellular signaling and phagosome acidification [95–100].

### 3.5.4. Modulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS)

Host invasion by pathogens frequently induces activation of many immunological mediators, including chemokines, cytokines, adhesion molecules, and enzymes that produce secondary inflammatory mediators such as NO. In macrophages, iNOS expression is activated by a number of immunological stimuli, such as IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and lipopolysaccharide (LPS) [101] and catalyzes the synthesis of high concentrations of NO [102]. *Leishmania* has mechanisms that interfere with NO production and thus facilitate survival inside the cells. It is also able to inhibit many of the cytokine-inducible macrophage functions necessary for the development of an effective immune response [103].

Early studies demonstrated that *L. major* LPG induced the production of IFN- $\gamma$ , and the expression of iNOS, resulting in host protection and parasite resistance in the mouse model [104,105]. The importance of iNOS was further confirmed when mice lacking the enzyme

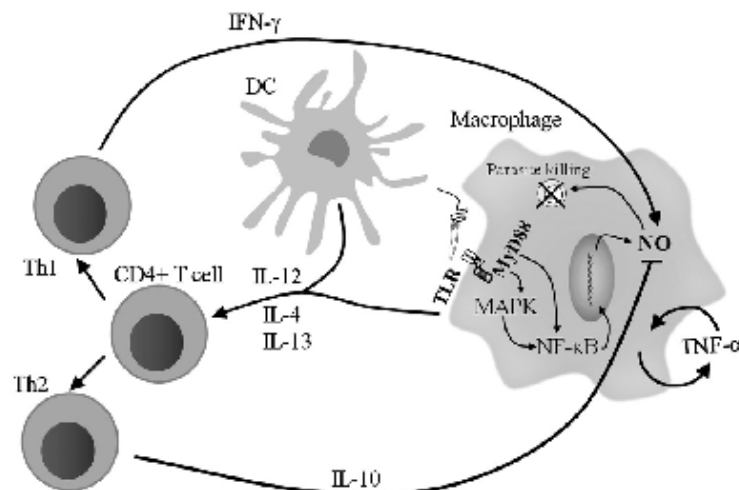
were unable to control infection in vivo and their macrophages did not eliminate promastigotes in vitro [106]. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) is a Th1-type proinflammatory cytokine crucial for NO generation in IFN- $\gamma$ -primed macrophages infected with *L. major* [107]. The importance of TNF- $\alpha$  and NO production was studied in mice infected with *L. major*, where mutants for this cytokine were not able to resist to infection [108]. In another study, *L. major* PGs synergized with IFN- $\gamma$  stimulating the macrophages to express high levels of iNOS and this induction was correlated with the complexity of PG structures [61]. Similarly, in the New World species, in vitro studies showed that IFN- $\gamma$  primed macrophages exposed to different types of *L. infantum* LPG triggered higher NO production by more complex type II and III LPGs [35]. On the other hand, *L. amazonensis* promastigotes inhibited the NO production induced by LPS in J774-G8 macrophages [109]. Furthermore, *L. mexicana* LPG was able to induce TNF- $\alpha$  via TLR2 and this production was dependent on the integrity of the lipid anchor [75]. Thus, either for Old or New World species of *Leishmania*, LPG was not able to induce NO in unprimed macrophages.

### 3.5.5. Cellular signaling and cytokine production

There are multiple ways by which intracellular pathogens like *Leishmania* take advantage of the host cell's machinery in order to survive and replicate. Interference with the host macrophages signaling transduction pathways is one of the survival strategies used by the parasites [78]. Those mechanisms occur due to events of phosphorylation and dephosphorylation in cascades of kinases and phosphatases. Mitogen-activated protein kinases (MAPKs), NF- $\kappa$ B pathways triggered via TLRs and CD40 have been implicated in *Leishmania* infection (reviewed in [110]). *Leishmania* LPG has been reported to activate innate immune signaling pathways in macrophages and NK cells through TLR2 [75,76]. In vivo studies with knock-out mice have further demonstrated the importance of other TLRs during *Leishmania* infection (reviewed in [111]). In *L. major* and *L. donovani* the roles of MyD88, TLR2, TLR3, TLR4 and TLR9 have

been demonstrated [75,77,112,113]. In *L. infantum*, TLR9, IL-12 and myeloid DCs are important for the activation of NK cells in controlling the parasite [114]. On the other hand, the development of a protective immune response to *L. mexicana* in the murine model does not appear to require IL-12 secretion [115], possibly contributing to the dispensability of LPG in this species. In contrast, in vitro studies demonstrated that dendritic cells mount a LPG-dependent proinflammatory transcriptional response to *L. mexicana* [116]. In another study, *L. mexicana* LPG was able to differentially impair the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in monocytes with a subsequent decrease in the IL-12 production [117]. In *L. braziliensis*, IL-12, TNF- $\alpha$  and iNOS were critical in the outcome of the disease in the murine model [118]. Furthermore, in this species the role of MyD88 was considered indispensable for the generation of protective immunity, whereas TLR2 had a regulatory role during the infection [119]. In *L. amazonensis*, disruption of the CD40/CD40L interaction enhanced the infection of the parasite, resulting in low production of IFN- $\gamma$ , lymphotoxin-TNF and NO [120]. In bone marrow-derived mast cells (BMMCs), the TLR2 expression was higher in C57BL/6 than in BALB/c mice. This also resulted in increased levels of TNF- $\alpha$ , IL-10 and MIP-1 $\alpha$  after in vitro stimulation with *L. mexicana* LPG [121]. Altogether, these studies indicate that the essential components of a protective immune response may vary depending on the *Leishmania* species and the mouse subset from where the cells were derived. Some of those mechanisms are represented in Fig. 6.

The MAP kinases are an important group of serine/threonine signaling kinases that are activated by dual phosphorylation in response to diverse extracellular stimuli, linking transmembrane signaling with gene induction events in the nucleus [122,123]. The first in vitro study using *L. major* metacyclic promastigotes and synthetic PG indicated that LPG differentially regulated IL-12 and NO production in macrophages. This occurred independently of NF- $\kappa$ B activation and the suppressive effect observed on IL-12 induction was resulting of ERK1/2 MAPKs activation [124]. The role of LPG in the activation of



**Fig. 6.** Immunological determinants influencing *Leishmania* infection. The *Leishmania* promastigote is phagocytosed by the macrophages. Activated dendritic cells (DC) and macrophages produce IL-12, which drives Th1 cell differentiation, proliferation and IFN- $\gamma$  production, which activate macrophages to produce NO and kill the parasites. In contrast, the production of IL-4 and IL-13 drives T cell differentiation into Th2, capable of producing IL-10 and additional IL-4, which inhibits NO production. This is associated with parasite survival and persistence of infection.

Please cite this article as: R.R. de Assis, et al., Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts, *Biochim. Biophys. Acta* (2011), doi:10.1016/j.bbagen.2011.11.001

MAPKs was confirmed by *lpg1*- and *lpg2*- mutants of *L. donovani*. Those parasites were able to activate higher levels of ERK1/2 MAPKs and could not sustain infection [125]. In another study, *Leishmania* LPG stimulated the activation of ERKs, p38 and JNK, and this appeared to be necessary for AP-1 activation, IL-12 and NO production [126].

Another important group involved in cell signaling is protein kinases C (PKCs). They are a family of at least 12 serine-threonine kinases activated by membrane phospholipids and are key kinases for activating effector genes and mount a protective response against aggressor pathogens [127]. Respiratory burst activity and NO production are regulated by phosphorylation events mediated by PKC. Not only *L. donovani* parasites, but also purified LPG is able to inhibit the oxidative burst through PKC in macrophages and increase intracellular survival of the parasites. The two mechanisms proposed are that LPG might act as a competitive inhibitor of PKC, or it could act as a chelator of  $Ca^{2+}$  that is required for PKC activity [94,128–131]. Regarding New World *Leishmania* species, *L. mexicana* purified LPG inhibited PKC $\alpha$  activity in BALB/c macrophages, reducing the oxidative burst and increasing parasite survival [92]. Another group involved in cell signaling is protein kinases R (PKRs). They are activated by a number of stimuli, such as dsRNA, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , and LPS [132–134]. In *L. amazonensis* infection, an increase in the activation of double-stranded RNA (dsRNA)-dependent in RAW cells was observed. The parasites could negatively modulate NF- $\kappa$ B activation and the subsequent NO production; this effect was correlated to the suppressive IL-10 production [65]. More recently, LPG from this species was found to increase the PKR transcript levels and this effect was via TLR2 [66].

In conclusion, the mechanism of LPG influencing signaling events is still a ripe area to study parasite–host interactions with New World species of *Leishmania*.

#### 4. Glycosylphospholipids (GIPLs)

##### 4.1. Interspecies and intraspecies variation in GIPLs structure

Besides LPG, another important class of GPI-anchored molecules in *Leishmania* is GIPLs. They are the most abundant glycolipid component of the cell membrane and are structurally analogous to protein and LPG anchors [11]. Due to their own structural features such as side chain modifications and fatty acids substitutions, they can be classified as a metabolically distinct family of molecules rather than a precursor or byproduct of GPI anchors [135,136]. Similar to LPG, GIPLs are also polymorphic in both glycan and lipid structures, although a conserved basic core is present in all *Leishmania* species studied to date. It consists of a Man $\alpha$ 1-4GlcN core linked to an alkyl-acylglycerol or a lyso-alkylglycerol through a phosphatidylinositol (PI). Different from other trypanosomatids, there is nonunsaturated fatty acid substitution of the lipid moiety [137].

These GIPLs structures are commonly divided into three distinct groups depending on whether the R-Man $\alpha$ 1- substitution occurs on the 3rd, 6th or both carbons. When the R-Man $\alpha$ 1- addition occurs on the 6th carbon of the proximal mannose, the resulting structures are classified as type-I GIPLs (mainly M2 and M3 GIPLs) which are structurally related to protein GPI anchors. When the substitution occurs on the 3rd carbon, the resulting GIPLs are classified as Type-II GIPLs (mainly IM2, GIPL-1, GIPL-2, GIPL-3 and GIPL-A) which are structurally related to LPG anchor. The third type is named Hybrid GIPLs in which there is R-Man $\alpha$ 1-substitutions to both 3rd and 6th carbons of the proximal mannose residue [11] (Fig. 7).

The first GIPL structure was reported from *L. major*. This early study showed a highly galactosylated glycan moiety linked to the lipid anchor through a non-N-acetylated glucosamine residue varying

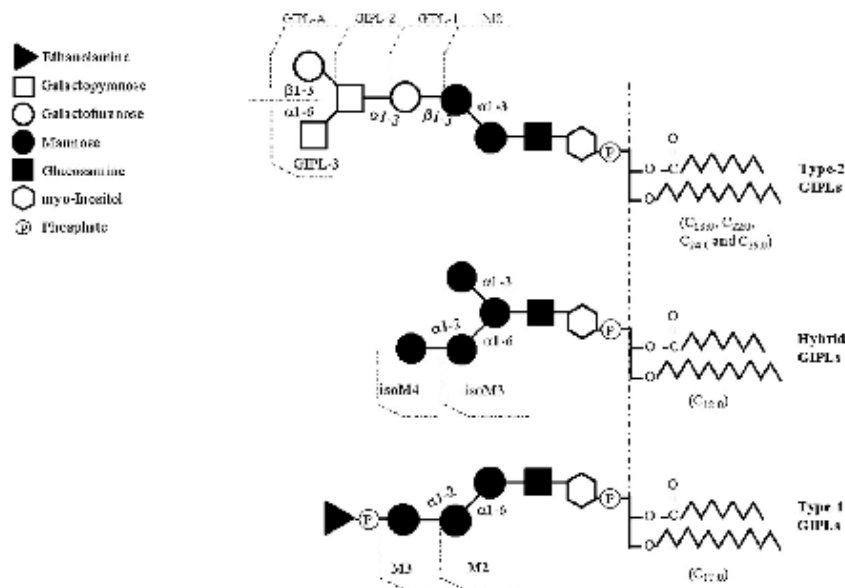


Fig. 7. Schematic representation of different types of glycosylphospholipids (GIPLs). *Leishmania* GIPLs are divided into three distinct groups: Type-I GIPLs are characterized by a R-Man $\alpha$ 1- addition to the sixth carbon of the proximal mannose residue; Type-II GIPLs have a R-Man $\alpha$ 1- substitution to the third carbon of the proximal mannose; Hybrid GIPLs have a R-Man $\alpha$ 1- substitution on both third and sixth carbons of the proximal mannose residue [11].

Please cite this article as: R.R. de Assis, et al., Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycosylphospholipids and interaction with hosts, *Biochim. Biophys. Acta* (2011), doi:10.1016/j.bbaga.2011.11.001

in length and polarity [138]. A more complete structure came later when it was shown that *L. major* expresses a myriad of GPIs with a general structure expressed as R-Gal $\beta$ 1-3Man $\alpha$ 1-3Man $\alpha$ 1-4GlcN-Pi [139]. This novel class of molecules ranges from simple Gal $\beta$ 1-3Man $\alpha$ 1-3Man $\alpha$ 1-4GlcN-Pi (GPI-1) structures to more complex Gal $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-3Gal $\alpha$ 1-6Gal $\beta$ 1-3Man $\alpha$ 1-3Man $\alpha$ 1-4GlcN-Pi (GPI-A) and Gal $\alpha$ 1-6Gal $\alpha$ 1-3Gal $\alpha$ 1-6Gal $\beta$ 1-3Man $\alpha$ 1-3Man $\alpha$ 1-4GlcN-Pi (GPI-3). Also these GPIs can be represented by its lyso-allylglycerol counterparts or even have a Glc( $\alpha$ -6) residue substitution onto the distal mannose [139,140].

Following the structural analysis of the *L. major* GPIs, the structure of *L. donovani* GPIs was elucidated. Chemical analysis and enzymatic sequencing revealed a new GPI profile that is different from *L. major* by being highly mannosylated. In *L. donovani*, the predominant GPIs had substitutions on both 3rd and 6th carbon of the proximal mannose of the Man $\alpha$ 1-4GlcN motif with mainly C<sub>14:0</sub>, C<sub>16:0</sub> and C<sub>18:0</sub> fatty acids. The main GPIs on this species are Man $\alpha$ 1-3Man $\alpha$ 1-4GlcN-Pi (isoM2) Man $\alpha$ 1-6(Man $\alpha$ 1-3)Man $\alpha$ 1-4GlcN-Pi (isoM3 GPIs) and Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-6(Man $\alpha$ 1-3)Man $\alpha$ 1-4GlcN-Pi (isoM4 GPIs) [18].

In 1993, the first New World species GPIs were characterized. *L. mexicana* GPIs structure shared close relation to *L. major* GPIs with a high degree of galactosylation and R-Man $\alpha$ 1- substitution to the 3rd carbon of the proximal mannose expressing mainly Gal $\alpha$ 1-6Gal $\alpha$ 1-3Gal $\alpha$ 1-6Gal $\beta$ 1-3Man $\alpha$ 1-3Man $\alpha$ 1-4GlcN-Pi (GPI-3), Gal $\alpha$ 1-3Gal $\alpha$ 1-6Gal $\beta$ 1-3Man $\alpha$ 1-3Man $\alpha$ 1-4GlcN-Pi (GPI-2) and Man $\alpha$ 1-3Man $\alpha$ 1-4GlcN-Pi (iM2 GPIs) [141].

While there is a wide polymorphism on GPI composition throughout different species, intraspecific polymorphisms are unknown. The structure of three different *L. major* strains together with other two Old World species, *L. aethiopia* and *L. tropica* was analyzed [142]. Interestingly, the intraspecific variance of the GPI composition was shown to be based mainly on relative quantities of each GPI species as all strains of *L. major* was shown to express GPI-1, GPI-2, GPI-3 with or without their phosphorylated counterparts (addition to a P-Glc to the Man $\alpha$ 1-6 residue). *L. aethiopia* and *L. tropica* were shown to have mainly mannosylated GPIs much like *L. donovani* also differing on their abundance.

The first and only study addressing a *Vannia* subgenus species was in *L. panamensis*. It was shown that *L. panamensis* GPIs had some unusual glycan and lipid structures. Chemical analysis showed that *L. panamensis* GPIs comprise mainly two glycan cores, the type-II GPIs Man $\alpha$ 1-3Man $\alpha$ 1-4GlcN-Pi and the Hybrid GPIs Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-6(Man $\alpha$ 1-3)Man $\alpha$ 1-4GlcN-Pi with the unusual extensions of Gal $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1, Gal $\alpha$ 1-2Gal $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1 or Gal $\alpha$ 1-3Gal $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1, never observed in any other *Leishmania* species. Another feature of *L. panamensis* GPIs, that is unusual compared to the other species, is the presence of diacylglycerol lipid moieties rather than alkyl-acylglycerol or 1-*o*-lyso-alkyl-glycerol. These are novel features of *Leishmania* GPIs, not yet observed in any other species [136].

Given that these molecules are expressed in high copy numbers on the surfaces of both promastigote and amastigote forms, understanding their role on *Leishmania* biology is crucial to understand how these parasites interact with their hosts. This may lead to alternative strategies to control *Leishmaniasis*.

#### 4.2. GPI interactions with sand fly and the vertebrate host

Although GPIs are expressed in a high copy number, their function on *Leishmania* biology is still unclear. Since these molecules share a common cellular enzyme machinery to GPI anchors, it is difficult to experimentally determine their specific relevance in the overall *Leishmania* biology. In contrast to LPG, there are no available studies involving GPIs and sand fly interaction and this is an open field to be explored.

The first reports on *Leishmania* GPIs were purely structural, and little was known about their biological significance. The first time

*Leishmania* GPIs were linked to a possible role on infection was in 1990 through the demonstration that GPIs could interact with humoral factors on the vertebrate host. *L. major* infected patients had high titers of anti- $\alpha$ -galactosyl antibodies [139]. This was later confirmed in other species such as *L. donovani*, *L. mexicana* and *L. braziliensis* [143].

As was conducted experimentally with LPG, several studies with glycosylation mutants of *Leishmania* have tried to determine the importance of GPIs biology on the innate cellular compartment. Most evidence points to a modulatory effect by down regulating classical macrophage activation thus promoting a silent, non-destructive entry into the host cell. *L. amazonensis* and *L. mexicana* mutants lacking some or all GPIs species have been generated, either by expressing heterologous phospholipases that can deplete mature GPIs and their precursors or by knocking out genes responsible for the addition of mannose to their structure. Although these mutants had little or no impact on promastigote growth in culture, a significant reduction was observed in vitro on *L. amazonensis* amastigote survival in macrophages and a significant impact on *L. mexicana* infectivity both in vitro and in vivo [144–147]. In a recent study with *L. braziliensis* GPIs, it was reported that they are not randomly distributed throughout the plasma membrane but are rather associated with high specialized microdomains. Depletion of these structures in this species reduced in vitro macrophage infectivity [148].

Several molecular mechanisms triggered by GPIs have been reported. It has been reported that TLR4 receptors are recognized by *Trypanosoma cruzi* GPIs [149] and although *Leishmania* GPIs are able to interact with cells, it is not clear if this occurs via TLRs. It has been shown that GPIs from *L. major* could inhibit the release of NO [150]. Later, it was demonstrated that *L. mexicana* GPIs could rapidly activate protein-tyrosine kinases (PTKs), but with no cell activation and cytokine release [151]. Interestingly, the PTK activation also required the minimal structure of Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-6Man $\alpha$ 1-4GlcN-Pi (M3 and isoM4 forms of *L. mexicana*) [137] and *L. donovani* [18]. This glycan structure can accommodate minor side chains additions without affecting its activity. On the other hand, *L. mexicana* GPIs were unable to activate PKC [151]. Consistent with this information, it was demonstrated that *L. major* GPIs and its synthetic lipid moiety also inhibited PKC [152,153]. Recently, GPIs from *L. infantum* and *L. braziliensis* were found to differentially inhibit NO production by mouse macrophages stimulated with IFN- $\gamma$  and LPS, with no effect on TNF- $\alpha$  release [154]. This observation is important evidence that *Leishmania* GPIs impair regulatory signals that can modulate the host cell response. Although the structures of the *L. infantum* and *L. braziliensis* GPIs are not fully elucidated, preliminary qualitative analysis on monosaccharide composition indicates that the former is very similar to type I or hybrid, whereas the latter is consistent of a type II GPIs [154].

#### 5. Concluding remarks

A great number of studies have implicated the importance of glycoconjugates in *Leishmania* biology either in New or Old World species of *Leishmania*. The structures of these molecules have exhibited a surprising polymorphism not only intra- but also interspecifically. Additionally, the expression of those molecules varies according to stage depending on the host, being able to modulate a variety of mechanisms to avoid parasite destruction. Although there are many questions still unanswered, especially regarding New World species, the lack of mutants and a precise host cells model warrant further investigations. It is intriguing how the structure and biology of those molecules has evolved in *Leishmania*, especially in the subgenus *Vannia*, where unique mechanisms of interaction occur in the sand fly and vertebrate host. Overall, understanding the mechanisms of how these parasite-derived molecules modulate important parasite-host interactions may result in alternative control strategies.

Please cite this article as: R.R. de Assis, et al., Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoisitolphospholipids and interaction with hosts, *Biochim. Biophys. Acta* (2011), doi:10.1016/j.bbagen.2011.11.001

## References

- [1] P. Desjeux, Leishmaniasis: current situation and new perspectives, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27 (2004) 305–318.
- [2] T.S. Tsuman, A.O. Santos, T. Ueda-Nakamura, R.P. Filho, C.V. Nakamura, Recent advances in leishmaniasis treatment, *Int. J. Infect. Dis.* 15 (2011) e525–e532.
- [3] V.S. Amato, F.F. Tson, A.M. Siqueira, A.C. Nicodemo, V.A. Neto, Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77 (2007) 265–274.
- [4] J.A. Guerra, S.R. Pinheiro, H. Silveira, L.I. Coelho, P. Gama, A. Moura, V. Amato, M.C. Barbosa, L.C. Ferreira, Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania (Vianna) braziliensis* and *Leishmania (Vianna) guyanensis* in the Brazilian Amazon, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5 (2011) e1880.
- [5] B.L. Herwaldt, Leishmaniasis, *Lancet* 354 (1999) 1191–1199.
- [6] S.L. Croft, S. Sanda, A.H. Falham, Drug resistance in leishmaniasis, *Chin. Microbiol. Rev.* 19 (2006) 111–126.
- [7] R. Lalson, J. Shaw, Evolution, classification and geographical distribution, in: W. Peters, R. Killick-Kendrick (Eds.), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1, Academic Press, London, 1987, pp. 1–120.
- [8] D.L. Sacks, P.V. Perkins, Identification of an infective stage of *Leishmania promastigotes*, *Science* 223 (1984) 1417–1419.
- [9] D. Sacks, S. Kamhawi, Molecular aspects of parasite–vector and vector–host interactions in leishmaniasis, *Annu. Rev. Microbiol.* 55 (2001) 463–483.
- [10] S.J. Turco, A. Desnoux, The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites, *Annu. Rev. Microbiol.* 46 (1992) 65–94.
- [11] M.J. McConville, M.A. Ferguson, The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositol in the parasite protozoa and higher eukaryotes, *Biochem. J.* 294 (Pt 2) (1993) 305–324.
- [12] M.J. McConville, A.K. Menon, Recent developments in the cell biology and biochemistry of glycosylphosphatidylinositol lipids (review), *Mol. Membr. Biol.* 17 (2000) 1–16.
- [13] T. Nadeau, J.E. Vinco, M.J. McConville, Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host, *Curr. Mol. Med.* 4 (2004) 649–665.
- [14] C. Yao, J.E. Donelson, M.E. Wilson, The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function, *Mol. Biochem. Parasitol.* 132 (2003) 1–16.
- [15] C. Yao, J. Luo, P. Stoffle, J.E. Donelson, M.E. Wilson, Multiple products of the *Leishmania chagasi* major surface protease (MSP or GP63) gene family, *Mol. Biochem. Parasitol.* 135 (2004) 171–183.
- [16] C.H. Hsiao, C. Yao, P. Stoffle, J.E. Donelson, M.E. Wilson, The major surface protease (MSP or GP63) in the intracellular amastigote stage of *Leishmania chagasi*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 157 (2008) 148–159.
- [17] E. Medina-Acosta, S.M. Beverley, D.G. Russell, Evolution and expression of the *Leishmania* surface protease (gp63) gene locus, *Infect. Agents Dis.* 2 (1993) 25–34.
- [18] M.J. McConville, J.M. Backwell, Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositol of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and a mitogenic glycolipid, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 15170–15179.
- [19] S.F. Moody, E. Handman, M.J. McConville, A. Bacik, The structure of *Leishmania major* amastigote lipophosphoglycan, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 18457–18466.
- [20] V. Bahr, Y.D. Sierhof, T. Ig, M. Demar, M. Quilstein, P. Overath, Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 58 (1993) 107–121.
- [21] P.F. Pinheiro, S.J. Turco, M.J. McConville, P.G. Lawyer, P.V. Perkins, D.L. Sacks, Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut, *Science* 256 (1992) 1812–1815.
- [22] P.F. Pinheiro, E.M. Saraiva, E. Rowton, G.B. Modi, L.A. Garaway, S.M. Beverley, S.J. Turco, D.L. Sacks, Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 9155–9159.
- [23] D.L. Sacks, G. Modi, E. Rowton, G. Spach, L. Epstein, S.J. Turco, S.M. Beverley, The role of phosphoglycans in *Leishmania*–sand fly interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 406–411.
- [24] P.A. Orlandi Jr., S.J. Turco, Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 10384–10391.
- [25] A. Desnoux, S.J. Turco, Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection, *Microbes Infect.* 4 (2002) 975–981.
- [26] A.B. Mahoney, D.L. Sacks, E. Saraiva, G. Modi, S.J. Turco, Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*–sand fly interactions, *Biochemistry* 38 (1999) 9813–9823.
- [27] M.J. McConville, S.J. Turco, M.A. Ferguson, D.L. Sacks, Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infective stage, *EMBO J.* 11 (1992) 3593–3600.
- [28] M.J. McConville, L.F. Schaur, C. Jaffe, P. Schneider, Structure of *Leishmania* lipophosphoglycans: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species, *Biochem. J.* 310 (Pt 3) (1995) 807–818.
- [29] D.L. Sacks, P.F. Pinheiro, M.J. McConville, P. Schneider, S.J. Turco, Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan, *J. Exp. Med.* 181 (1995) 685–697.
- [30] R.P. Soares, T. Barros, K. McCoy-Simandlu, M. Svobodova, A. Warburg, S.J. Turco, *Leishmania major*: intra-specific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by different *Phlebotomus* species, *Exp. Parasitol.* 107 (2004) 105–114.
- [31] T. Ig, R. Egges, P. Overath, M.J. McConville, J. Thomas-Gates, J. Thomas, S.W. Homans, M.A. Ferguson, Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 6834–6840.
- [32] R.P. Soares, M.E. Macedo, C. Robert, N.F. Gontijo, I.C. Almeida, R.T. Gazzinelli, P.F. Pinheiro, S.J. Turco, *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 121 (2002) 213–224.
- [33] T.L. Barron, S.J. Turco, Quantitation of *Leishmania* lipophosphoglycan repeats by capillary electrophoresis, *Biochim. Biophys. Acta* 1760 (2006) 710–714.
- [34] R.P. Soares, T.L. Cardoso, T. Barron, M.S. Araujo, P.F. Pinheiro, S.J. Turco, *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis, *Int. J. Parasitol.* 35 (2005) 245–253.
- [35] J.M. Coelho-Finamore, V.C. Freitas, R.R. Assis, M.N. Melo, N. Novozhilova, N.F. Secundino, P.F. Pinheiro, S.J. Turco, R.P. Soares, *Leishmania infantum*: lipophosphoglycan intra-specific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts, *Int. J. Parasitol.* 41 (2011) 333–342.
- [36] S. Kamhawi, Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* 22 (2005) 439–446.
- [37] J. Myskova, M. Svobodova, S.M. Beverley, P. Volt, A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies, *Microbes Infect.* 9 (2007) 317–324.
- [38] R. Wilson, M.D. Bates, A. Dastabova, L. Jecia, R.J. Dillon, P. Volt, P.A. Bates, Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4 (2010) e1816.
- [39] P.A. Bates, *Leishmania* sand fly interactions: progress and challenges, *Curr. Opin. Microbiol.* 11 (2008) 340–344.
- [40] S. Kamhawi, M. Ramallo-Ortega, V.M. Pham, S. Kumar, P.G. Lawyer, S.J. Turco, C. Bastias-Mary, D.L. Sacks, J.G. Valestanzila, A role for insect galactin in parasite survival, *Cell* 119 (2004) 329–341.
- [41] R.J. Dillon, A.C. Ives, C. Chardet, N. Holtroyd, M.A. Quail, M.E. Rogers, M.B. Soares, M.F. Bonaldi, T.L. Casavant, M.J. LeHane, P.A. Bates, Analysis of ESTs from *Lutzomyia longipalpis* sand flies and their contribution toward understanding the insect–parasite relationship, *Genomics* 88 (2006) 831–840.
- [42] R.P. Soares, S.J. Turco, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae): a review, *An. Acad. Bras. Cienc.* 75 (2003) 301–330.
- [43] P. Volt, J. Myskova, Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors, *Trends Parasitol.* 23 (2007) 91–92.
- [44] P. Volt, I. Benikova, J. Myskova, J. Sadlova, L. Campino, C. Ravel, Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids, *Int. J. Parasitol.* 37 (2007) 589–593.
- [45] R.J. Azevedo-Pereira, M.C. Pereira, F.D. Oliveira-Junior, R.P. Brasil, L.M. Gomes, M.F. Madeira, A.L. Santos, I. Toma, C.R. Alves, Hepatic binding proteins from *Leishmania (Vianna) braziliensis* promastigotes, *Ver. Parasitol.* 145 (2007) 234–239.
- [46] R.P. Soares, C. Margonari, N.C. Secundino, M.E. Macedo, S.M. da Costa, E.F. Rangeli, P.F. Pinheiro, S.J. Turco, Differential midgut attachment of *Leishmania (Vianna) braziliensis* in the sand flies *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* and *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*, *J. Biomed. Biotechnol.* (2010) 430174.
- [47] T. Ig, Y.D. Sierhof, R. Egges, M. Adria, D. Harbeck, P. Overath, Secreted acid phosphatase of *Leishmania mexicana*: a filamentous phosphoglycoprotein polymer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 8774–8778.
- [48] T. Ig, R. Metz, G. Winter, D.G. Russell, R. Egges, D. Schell, P. Overath, Monoclonal antibodies to *Leishmania mexicana* promastigote antigens. I. Secreted acid phosphatase and other proteins share epitopes with lipophosphoglycan, *J. Cell Sci.* 99 (Pt 1) (1991) 175–180.
- [49] T. Ig, Y.D. Sierhof, M. Wiese, M.J. McConville, P. Overath, Characterization of phosphoglycan-containing secretory products of *Leishmania*, *Parasitology* 108 (1994) 563–571 (Suppl.).
- [50] T. Ig, P. Overath, M.A. Ferguson, T. Rutherford, D.G. Campbell, M.J. McConville, O- and N-glycosylation of the *Leishmania mexicana*-secreted acid phosphatase. Characterization of a new class of phosphoserine-linked glycans, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 24073–24081.
- [51] T. Ig, E. Handman, Y.D. Sierhof, Protozoophosphoglycans from *Leishmania* promastigotes and amastigotes, *Biochem. Soc. Trans.* 27 (1999) 518–525.
- [52] J.K. Lovelace, M. Gottlieb, Comparison of extracellular acid phosphatases from various isolates of *Leishmania*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35 (1986) 1121–1128.
- [53] M.E. Rogers, T. Ig, A.V. Nikolov, M.A. Ferguson, P.A. Bates, Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of IFG, *Nature* 430 (2004) 463–467.
- [54] M. Rogers, P. Kropf, B.S. Choi, R. Dillon, M. Podinowska, P. Bates, L. Muller, Protozoophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival, *PLoS Pathog.* 5 (2009) e1000555.
- [55] M.E. Rogers, K. Corware, L. Muller, P.A. Bates, *Leishmania infantum* protozoophosphoglycans regurgitated by the bite of its natural sand fly vector, *Lutzomyia longipalpis*, promote parasite establishment in mouse skin and skin-derived tissues, *Microbes Infect.* 12 (2010) 875–879.
- [56] P.A. Bates, Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies, *Int. J. Parasitol.* 37 (2007) 1097–1106.
- [57] A. Piani, T. Ig, A.G. Befary, J. Curtis, E. Handman, *Leishmania major* protozoophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function, *Microbes Infect.* 1 (1999) 589–599.
- [58] C. Bugdan, M. Rollinghoff, How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol. Today* 15 (1999) 22–28.

Please cite this article as: RR. de Assis, et al., Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts, *Biochim. Biophys. Acta* (2011), doi:10.1016/j.bbaga.2011.11.001

- [59] J.F. Dermine, S. Sclianimanco, C. Prive, A. Descoteaux, M. Desjardins, *Leishmania promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis*, *Cell. Microbiol.* 2 (2000) 115–126.
- [60] A. Brittingham, D.M. Moser, *Exploitation of the complement system by Leishmania promastigotes*, *Parasitol. Today* 12 (1996) 444–447.
- [61] L. Proudford, A.V. Nikitchev, G.J. Feng, W.Q. Wei, M.A. Ferguson, J.S. Bittencourt, F.Y. Liew, *Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of Leishmania lipophosphoglycan in murine macrophages*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1996) 10984–10989.
- [62] D. Piedrafitá, L. Proudford, A.V. Nikitchev, D. Xu, W. Sands, G.J. Feng, E. Thomas, J. Brewer, M.A. Ferguson, J. Alexander, F.Y. Liew, *Regulation of macrophage IL-12 synthesis by Leishmania lipophosphoglycans*, *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 235–244.
- [63] J.R. Giorgione, S.J. Turco, R.M. Epan, *Transitory inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from Leishmania donovani*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (1989) 11634–11639.
- [64] A.R. Guimarães-Costa, M.T. Nascimento, G.S. Frome Jr., R.P. Soares, F.N. Morgado, F. Goncalves-Silva, E.M. Saraiva, *Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009) 6748–6753.
- [65] R.M. Pereira, K.L. Teixeira, V. Barreto-de-Souza, T.C. Calogeri-Silva, L.D. De-Melo, D.C. Soares, D.C. Bou-Habib, A.M. Silva, E.M. Saraiva, U.G. Lopes, *Novel role for the double-stranded RNA-activated protein kinase PKR: modulation of macrophage infection by the protozoan parasite Leishmania*, *FASEB J.* 24 (2010) 617–626.
- [66] A. de Carvalho Vilarini, R.D. Pereira, K.L. Dias Teixeira, T.C. Calogeri-Silva, M. Bello, M.D. Laurenti, C.E. Corbett, C.M. de Castro Gomes, R.P. Soares, A. Mendes Silva, F.T. Silveira, U.G. Lopes, *Human cutaneous leishmaniasis: interferon-dependent expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) via TLR2*, *FASEB J.* 25 (2011) 1–12.
- [67] R.T. Gazzinelli, C. Ropert, M.A. Campos, *Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites*, *Immunol. Rev.* 201 (2004) 9–25.
- [68] M.E. Wilson, R.D. Pearson, *Evidence that Leishmania donovani utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism*, *J. Immunol.* 136 (1986) 4681–4688.
- [69] M.E. Wilson, R.D. Pearson, *Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of Leishmania donovani by human mononuclear phagocytes*, *Infect. Immun.* 56 (1988) 361–369.
- [70] N. Ueno, C.I. Brait, N.E. Rodriguez, M.E. Wilson, *Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between leishmanicidal and non-leishmanicidal human macrophages*, *Cell. Microbiol.* 11 (2009) 1827–1841.
- [71] R.P. De Silva, B.F. Hall, K.A. Joiner, D.L. Sacks, G.I., *The C3b receptor, mediates binding of infective Leishmania major metacyclic promastigotes to human macrophages*, *J. Immunol.* 148 (1992) 617–622.
- [72] D.M. Moser, P.J. Edelson, *The mouse macrophage receptor for C3b (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of Leishmania promastigotes*, *J. Immunol.* 135 (1985) 2785–2789.
- [73] P.E. Klima, S.I. Constant, L. Hanum, M. Colmenares, K.S. Lee, A.M. Hoberman, M.J. Slomchick, D. McMahon-Pratt, *Internalization of Leishmania mexicana complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis*, *J. Exp. Med.* 191 (2000) 1063–1068.
- [74] U.M. Padgett, J.F. Farrell, *Control of infection with Leishmania major in susceptible BALB/c mice lacking the common gamma-chain for FcR is associated with reduced production of IL-10 and TGF-beta by paratized cells*, *J. Immunol.* 174 (2005) 6340–6346.
- [75] M.J. de Veer, J.M. Curtis, T.M. Baldwin, J.A. DiDonato, A. Sexton, M.J. McConville, E. Handman, L. Schofield, *MyD88 is essential for clearance of Leishmania major: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling*, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 2822–2831.
- [76] I. Becker, N. Salazar, M. Aguilera, J. Delgado, N. Carrillo-Carrasco, L.G. Kobeh, A. Ruiz, R. Cervantes, A.P. Torres, N. Cabrera, A. Gonzalez, C. Maldonado, A. Iribari, *Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 130 (2003) 65–74.
- [77] J.F. Randolph, F. Chaiq, A. Descoteaux, *RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of Leishmania donovani promastigotes by interleukin-gamma-primed macrophages*, *Eur. J. Immunol.* 36 (2006) 411–420.
- [78] D.J. Gregory, M. Olivier, *Subversion of host cell signaling by the protozoan parasite Leishmania*, *Parasitology* 130 (2005) S27–S35 (Suppl.).
- [79] T. Iig, *Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by Leishmania mexicana*, *EMBO J.* 19 (2000) 1953–1962.
- [80] T. Iig, M. Demar, D. Hatbeck, *Phosphoglycan repeat-deficient Leishmania mexicana parasites remain infectious to macrophages and mice*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 4888–4897.
- [81] S.J. Turco, G.F. Spath, S.M. Beverley, *Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between Leishmania species*, *Trends Parasitol.* 17 (2001) 223–226.
- [82] N.C. Perera, J.G. Egen, N. Secundino, A. Debrahan, N. Kimbiri, S. Kamhawi, P. Lawyer, M.P. Fay, R.N. Germain, D. Sacks, *In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies*, *Science* 321 (2008) 970–974.
- [83] P. Guérard, A. Lapierre, C. Randoia, G. Milon, M. Desjardins, *Trafficking of Leishmania donovani promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages*, *Cell. Microbiol.* 10 (2008) 100–111.
- [84] V. Bittencourt, A. Zychlinsky, *Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs*, *Nat. Rev. Microbiol.* 5 (2007) 577–582.
- [85] C. Gabriel, W.R. McMaster, D. Girard, A. Descoteaux, *Leishmania donovani promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps*, *J. Immunol.* 185 (2010) 4319–4327.
- [86] M. Desjardins, A. Descoteaux, *Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan*, *J. Exp. Med.* 185 (1997) 2061–2068.
- [87] D.G. Russell, S. Xu, P. Chaturvedi, *Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of Leishmania mexicana-infected macrophages*, *J. Cell Sci.* 103 (Pt 4) (1992) 1189–1210.
- [88] L.A. Allen, A. Ademi, *Protein kinase C regulates MARCKS cycling between the plasma membrane and lysosomes in fibroblasts*, *EMBO J.* 14 (1995) 1109–1121.
- [89] A. Rosen, K.F. Keenan, M. Thelen, A.C. Nairn, A. Ademi, *Activation of protein kinase C results in the displacement of its myristoylated, alanine-rich substrate from punctate structures in macrophage filopodia*, *J. Exp. Med.* 172 (1990) 1211–1215.
- [90] A. Holm, K. Tejle, K.E. Magnusson, A. Descoteaux, B. Rasmussen, *Leishmania donovani lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKCalpha and defective phagosome maturation*, *Cell. Microbiol.* 3 (2001) 439–447.
- [91] A. Holm, K. Tejle, T. Gunnarsson, K.E. Magnusson, A. Descoteaux, B. Rasmussen, *Role of protein kinase Calpha for uptake of unpolymerized prey and phagosomal maturation in macrophages*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302 (2003) 653–658.
- [92] J. Delgado-Dominguez, H. Gonzalez-Aguilar, M. Aguilera-Garcia, L. Cabrera-Kobeh, M. Gomez-Oroz, A. Ruiz-Romero, M. Bello-Rivas, I. Becker, *Leishmania mexicana lipophosphoglycan differentially regulates PKCalpha-induced oxidative burst in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice*, *Parasite Immunol.* 32 (2010) 440–449.
- [93] D.L. Tolson, S.J. Turco, T.W. Pearson, *Expression of a repeating phosphotyrosine disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with Leishmania donovani*, *Infect. Immun.* 58 (1990) 3500–3507.
- [94] J.F. Dermine, G. Goyette, M. Houde, S.J. Turco, M. Desjardins, *Leishmania donovani lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages*, *Cell. Microbiol.* 7 (2005) 1263–1270.
- [95] A.F. Viner, S. Janaqi, S.J. Turco, M. Fukuda, A. Descoteaux, *Exclusion of synaptotagmin V at the phagocytic cup by Leishmania donovani lipophosphoglycan results in decreased promastigote internalization*, *Micobiology* 157 (2011) 2619–2628.
- [96] R. Gag, R. Lodge, A. Descoteaux, M.J. Tremblay, *Leishmania infantum promastigotes reduce entry of HIV-1 into macrophages through a lipophosphoglycan-mediated disruption of lipid rafts*, *J. Infect. Dis.* 197 (2008) 1701–1708.
- [97] L. Milas, A. Stafford, S. Niu, S.J. Turco, T.D. Raaijman, R.M. Epan, *Protein inhibition of viral fusion by the lipophosphoglycan of Leishmania donovani*, *Biochemistry* 34 (1995) 4676–4680.
- [98] J. Morris, S.J. Turco, R.M. Epan, J.M. Ruysschaert, *Lipophosphoglycan of Leishmania donovani inhibits lipid vesicle fusion induced by the N-terminal extremity of viral fusogenic simian immunodeficiency virus protein*, *Eur. J. Biochem.* 258 (1998) 150–156.
- [99] R. Lodge, T.O. Diallo, A. Descoteaux, *Leishmania donovani lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosomal membrane*, *Cell. Microbiol.* 8 (2006) 1922–1931.
- [100] M.E. Winberg, A. Holm, E. Sandahl, A.F. Viner, A. Descoteaux, K.E. Magnusson, B. Rasmussen, M. Lerm, *Leishmania donovani lipophosphoglycan inhibits phagosomal maturation via action on membrane rafts*, *Microbes Infect.* 11 (2009) 215–222.
- [101] F.P. Huang, W. Niedbala, X.Q. Wei, D. Xu, G.J. Feng, J.H. Robinson, C. Lam, F.Y. Liew, *Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages*, *Eur. J. Immunol.* 28 (1998) 4062–4070.
- [102] S. Moncada, A. Higgs, *The L-arginine-nitric oxide pathway*, *N. Engl. J. Med.* 329 (1998) 2002–2012.
- [103] M. Olivier, D.J. Gregory, G. Foget, *Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view*, *Clin. Microbiol. Rev.* 18 (2005) 293–305.
- [104] F.Y. Liew, Y. Li, D. Moss, C. Parkinson, M.V. Rogers, S. Moncada, *Resistance to Leishmania major infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages*, *Eur. J. Immunol.* 21 (1991) 3009–3014.
- [105] S. Stenger, H. Thuring, M. Rollinghoff, C. Bogdan, *Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to Leishmania major*, *J. Exp. Med.* 180 (1994) 783–793.
- [106] X.Q. Wei, L.G. Charles, A. Smith, J. Ure, G.J. Feng, F.P. Huang, D. Xu, W. Muller, S. Moncada, F.Y. Liew, *Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase*, *Nature* 375 (1995) 408–411.
- [107] S.J. Green, R.M. Crawford, J.T. Hockmeyer, M.S. Meltzer, C.A. Nacy, *Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha*, *J. Immunol.* 145 (1990) 4290–4297.
- [108] P. Wilhelm, U. Rixe, S. Labbe, N. Donhauser, M. Rollinghoff, C. Bogdan, H. Komer, *Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF*, *J. Immunol.* 166 (2001) 4012–4019.
- [109] F.M. Balestieri, A.R. Queiroz, C. Scavone, V.M. Costa, M. Barnal-Neto, A. Abrahamsohn Me, *Leishmania (L.) amazonensis-induced inhibition of nitric oxide synthase in host macrophages*, *Microbes Infect.* 4 (2002) 23–29.
- [110] S. Bhandari, N. Srivastava, R. Sadas, B. Saha, *Leishmania interferes with host cell signaling to devise a survival strategy*, *J. Biomed. Biotechnol.* 2010 (2010) 109189.

Please cite this article as: R.R. de Assis, et al., *Glycoconjugates in New World species of Leishmania: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoisotopospholipids and interaction with hosts*, *Biochim. Biophys. Acta* (2011), doi:10.1016/j.bbagen.2011.11.001



- [111] FF. Tsou, V.S. Amato, H.A. Bacha, T. Almusawi, M.J. Duarte, V. Amato Neto, Toll-like receptors and leishmaniasis, *Infect. Immun.* 76 (2008) 866–872.
- [112] P. Knopf, N. Freudenberg, C. Kals, M. Modolell, S. Henz, C. Galanos, M. Freudenberg, I. Müller, Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNCr mice with *Leishmania major* reveals a role for Toll-like receptor 4 in the control of parasite replication, *J. Leukoc. Biol.* 76 (2004) 48–57.
- [113] P. Knopf, M.A. Freudenberg, M. Modolell, H.P. Fribe, S. Herath, S. Antoniazzi, C. Galanos, D.F. Smith, I. Müller, Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*, *Infect. Immun.* 72 (2004) 1920–1928.
- [114] U. Schölicher, J. Liese, I. Knippenz, C. Kummann, A. Hesse, A. Heit, J.A. Fischer, S. Weiss, U. Kalinke, S. Kunz, C. Bogdan, NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs, *J. Exp. Med.* 204 (2007) 893–906.
- [115] L.J. Barucham, J.E. Uzonna, M.H. Goldschmidt, P. Scott, Control of New World cutaneous leishmaniasis is IL-12 independent but STAT4 dependent, *Eur. J. Immunol.* 32 (2002) 3205–3215.
- [116] T. Abelscher, C.L. Bennett, M. Pelizzola, C. Vizzariello, N. Pavella, M. Urbano, M. Capozzoli, A. Luchini, T. Ilg, F. Grassucci, C.C. Blackburn, P. Ricciardi-Castagnoli, A critical role for lipophosphoglycan in proinflammatory responses of dendritic cells to *Leishmania mexicana*, *Eur. J. Immunol.* 35 (2005) 476–486.
- [117] J. Argüeta-Donohue, N. Garrido, L. Valdes-Reyes, A. Zentella, M. Aguirre-García, L. Becker, L. Gutiérrez-Kobeh, *Leishmania mexicana*: participation of NF- $\kappa$ B in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG), *Exp. Parasitol.* 120 (2008) 1–9.
- [118] F.J. Rocha, U. Schölicher, J. Matzner, C. Alber, C. Bogdan, Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice, *Infect. Immun.* 75 (2007) 3823–3832.
- [119] D.A. Vargas-Inchaustegui, W. Tai, L. Xin, A.E. Hogg, D.B. Corry, L. Soong, Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice, *Infect. Immun.* 77 (2009) 2948–2956.
- [120] I. Soong, J.C. Xu, S. Grewal, P. Kima, J. Sun, S.J. Longley Jr., N.H. Ruddle, D. McMahon-Fran, R.A. Flavell, Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection, *Immunology* 4 (1996) 263–273.
- [121] M.J. Villaseca-Garfón, N. Salazar, J. Delgado, L. Gutiérrez-Kobeh, A. Pérez-Torres, I. Becker, Mac cells are activated by *Leishmania mexicana* LPG and regulate the disease outcome depending on the genetic background of the host, *Parasite Immunol.* 30 (2008) 425–434.
- [122] M. Karin, Signal transduction from cell surface to nucleus in development and disease, *FASEB J.* 6 (1992) 2581–2590.
- [123] A. Radler-Pohl, C. Sachsenmaier, S. Gebel, H.P. Auer, J.T. Brader, U. Rapp, P. Angel, H.J. Rahmsdorf, P. Herrlich, UV-induced activation of AP-1 involves obligatory extracellular steps including Raf-1 kinase, *EMBO J.* 12 (1993) 1005–1012.
- [124] G.J. Feng, H.S. Goodridge, M.M. Harnett, X.Q. Wei, A.V. Niklasov, A.P. Higson, F.Y. Liew, Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: *Leishmania phosphoglycans* subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK/MAP kinase, *J. Immunol.* 163 (1999) 6403–6412.
- [125] C. Pribe, A. Descoixaux, *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages, *Eur. J. Immunol.* 30 (2000) 2235–2244.
- [126] S. Balaraman, V.K. Singh, P. Tewary, R. Madhubala, *Leishmania* lipophosphoglycan activates the transcription factor activating protein 1 in J774A1 macrophages through the extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein kinase, *Mol. Biochem. Parasitol.* 139 (2005) 117–127.
- [127] Y. Nishizuka, The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation, *Nature* 334 (1988) 661–665.
- [128] A. Descoixaux, S.J. Turco, The lipophosphoglycan of *Leishmania donovani* macrophage protein kinase C, *Parasitol. Today* 9 (1993) 468–471.
- [129] K.J. Moon, S. Labrecque, G. Marikawald, Alteration of *Leishmania donovani* infection levels by selective impairment of macrophage signal transduction, *J. Immunol.* 150 (1993) 4467–4468.
- [130] M. Olivier, R.W. Bowdsey, N.E. Reiser, Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 7481–7485.
- [131] A. Descoixaux, C. Matshewski, S.J. Turco, Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan, *J. Immunol.* 149 (1992) 3008–3015.
- [132] G.L. Gasella, T. Musco, S.E. Remschaldt, K. Pulkrá, I. Varesio, Potential requirement of a functional double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) for the tumoricidal activation of macrophages by lipopolysaccharide or IFN- $\alpha$  beta, but not IFN- $\gamma$ , *J. Immunol.* 154 (1995) 345–354.
- [133] M.C. Young, J. Liu, A.S. Lau, An essential role for the interferon-inducible, double-stranded RNA-activated protein kinase PKR in the tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis in U937 cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 12451–12455.
- [134] K.C. Goh, M.J. de Vee, B.R. Williams, The protein kinase PKR is required for p38 MAPK activation and the innate immune response to bacterial endotoxin, *EMBO J.* 19 (2000) 4292–4297.
- [135] S. Lillio, M.C. Field, P. Blundell, G.H. Coombs, J.C. Morrison, Essential roles for GPI-anchored proteins in African trypanosomes revealed using mutants deficient in GPI, *Mol. Biol. Cell* 14 (2003) 1182–1194.
- [136] J. Zawadzki, C. Scholtz, G. Currie, G.H. Coombs, M.J. McConville, The glycosylated phospholipids from *Leishmania panamensis* contain unusual glycan and lipid moieties, *J. Mol. Biol.* 282 (1998) 287–299.
- [137] J.E. Ralton, M.J. McConville, Delineation of three pathways of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis in *Leishmania mexicana*. Precursors from different pathways are assembled on distinct pools of phosphatidylinositol and undergo fatty acid remodeling, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 4245–4257.
- [138] M.J. McConville, A. Basic, A family of glycosylated phospholipids from *Leishmania major*. Isolation, characterization, and antigenicity, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 757–766.
- [139] M.J. McConville, S.W. Homans, J.E. Thomas-Gates, A. Dell, A. Basic, Structures of the glycosylated phospholipids from *Leishmania major*. A family of novel galactarosanose-containing glycolipids, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 7385–7394.
- [140] P. Proudfoot, P. Schneider, M.A. Ferguson, M.J. McConville, Biosynthesis of the glycolipid anchor of lipophosphoglycan and the structurally related glycosylated phospholipids from *Leishmania major*, *Biochem. J.* 308 (Pt 1) (1995) 45–55.
- [141] M.J. McConville, T.A. Collidge, M.A. Ferguson, P. Schneider, The glycosylated phospholipids of *Leishmania mexicana* promastigotes. Evidence for the presence of three distinct pathways of glycolipid biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 15595–15604.
- [142] P. Schneider, L.F. Schurz, C.L. Jaffe, M.A. Ferguson, M.J. McConville, Glycosylated phospholipid profiles of four serotypically distinct Old World *Leishmania* strains, *Biochem. J.* 304 (Pt 2) (1994) 603–609.
- [143] J.L. Avila, M. Rojas, A. Acosta, Glycosylated phospholipids from American *Leishmania* and *Trypanosoma* spp. partial characterization of the glycan core and the human humoral immune response to them, *J. Clin. Microbiol.* 29 (1991) 2305–2312.
- [144] K. Mitsu-Wilms, N. Garg, B.S. McGwin, H.G. Lu, L. Zhong, D.A. Aronah, J.H. Lubowitz, K.P. Chang, Roles of five GPIs in anaerobiosis of *Leishmania*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 99 (1999) 103–116.
- [145] S.C. Ilgouatz, J.L. Zawadzki, J.E. Ralton, M.J. McConville, Evidence that five GPI glycolipids are essential for growth of *Leishmania mexicana*, *EMBO J.* 18 (1999) 2746–2755.
- [146] J.E. Ralton, T. Naderer, H.L. Pikano, T.A. Bishanznyk, J.M. Callaghan, M.J. McConville, Evidence that intracellular beta-1,2-mannan is a virulence factor in *Leishmania* parasites, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 40757–40763.
- [147] A. Garami, A. Mehlert, T. Ilg, Glycosylation defects and virulence phenotypes of *Leishmania mexicana* phosphomannosidase and dolicholphosphate-mannose synthase gene deletion mutants, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 8166–8183.
- [148] K.A. Yoneyama, A.K. Tanaka, T.G. Silveira, H.K. Takahashi, A.H. Straus, Characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* membrane microdomes, and their role in macrophage infectivity, *J. Lipid Res.* 47 (2006) 2171–2178.
- [149] A.C. Oliveira, J.R. Peixoto, L.B. de Arruda, M.A. Campos, R.T. Gazzinelli, D.T. Golshock, S. Akira, J.O. Preiss, L. Mendonça-Pavão, A. Nobrega, M. Bello, Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycosylated phospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*, *J. Immunol.* 173 (2004) 5688–5696.
- [150] I. Proudfoot, C.A. O'Donnell, F.Y. Liew, Glycosylated phospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and induce leishmanicidal activity in murine macrophages, *Eur. J. Immunol.* 25 (1995) 745–750.
- [151] S.D. Tachado, P. Gomez, R. Schwam, S. Nowakovic, M. McConville, L. Schofield, Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 4023–4027.
- [152] T.B. McNeely, G. Rosen, M.V. Loundser, S.J. Turco, Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*, *Biochem. J.* 259 (1989) 601–604.
- [153] M. Chawla, R.A. Vishwakarma, Alkylacylglycerolipid domain of GPI molecules of *Leishmania* is responsible for inhibition of PKC-mediated c-fos expression, *J. Lipid Res.* 44 (2003) 594–600.
- [154] R.R. Assis, I.C. Brain, F.S. Nonaka, S.J. Turco, R.P. Soares, Glycosylated phospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure, *PLoS Negl. Trop. Dis.* (submitted for publication).
- [155] J.R. Thomas, M.J. McConville, J.E. Thomas-Gates, S.W. Homans, M.A. Ferguson, P.A. Goris, K.D. Greis, S.J. Turco, Refined structure of the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 6829–6833.
- [156] M.J. McConville, J.E. Thomas-Gates, M.A. Ferguson, S.W. Homans, Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 19611–19623.
- [157] G. Winter, M. Fuchs, M.J. McConville, V.D. Stierhof, P. Ovestad, Surface antigens of *Leishmania mexicana* mastigotes: characterization of glycosylated phospholipids and a macrophage-derived glycosphingolipid, *J. Cell Sci.* 107 (Pt 9) (1994) 2471–2482.

Please cite this article as: R.R. de Assis, et al., Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycosylated phospholipids and interaction with hosts, *Biochim. Biophys. Acta* (2011), doi:10.1016/j.bbaga.2011.11.001

## 10 Referências Bibliográficas

- Ajizian SJ, English BK, Meals EA. Specific inhibitors of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$ . *J Infect Dis* 1999; 179 (4): 939–944.
- Akira S e Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499–511.
- Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 2000; 30(12-13):1269-81.
- Assis RR, Ibraim IC, Nogueira PM, Soares RP, Turco SJ. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochim Biophys Acta* 2012(a) (in press).
- Assis RR, Ibraim IC, Noronha FS, Turco SJ, Soares RP. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. *PLoS Negl Trop Dis* 2012(b); 6 (2): e1543.
- Awasthi A, Mathur R, Khan A, Joshi BN, Jain N, Sawant S, Boppana R, Mitra D, Saha B. CD40 signaling is impaired in *L. major*-infected macrophages and is rescued by a p38MAPK activator establishing a host-protective memory T cell response. *J Exp Med*. 2003 Apr 21;197(8):1037-43. Epub 2003 Apr 14.
- Balaraman S, Singh VK, Tewary P, Madhubala R. *Leishmania* lipophosphoglycan activates the transcription factor activating protein 1 in J774A.1 macrophages through the extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Biochem Parasitol*. 2005; 139(1):117–127.
- Barata RA, França-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Lorosa ES, et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38:421- 425.
- Barron TL, Turco SJ. Quantitation of *Leishmania* lipophosphoglycan repeat units by capillary electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760:710–714.
- Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres AP, Cabrera N, González A, Maldonado C, Isibasi A. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 130: 65-74.
- Bhowmick S, Mazumdar T, Ali N. Vaccination route that induces transforming growth factor  $\beta$  production fails to elicit protective immunity against *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun* 2009; 77(4):1514– 1523.
- Brittingham A, Mosser DM. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol Today* 1996;12:444–447.

- Butcher BA, Turco SJ, Hiltys BA, Pimenta PF, Panunzio M, Sacks DL, *et al.* Deficiency in  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase of a *Leishmania major* lipophosphoglycan mutant adversely influences the *Leishmania*-sandfly interaction. *J Biol Chem* 1996; 271(34): 20573-9.
- Camargo MM, Andrade AC, Almeida IC, Travassos LR, Gazzinelli RT. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN  $\gamma$ -primed macrophages. *J Immunol* 1997; 159: 6131-6139.
- Carpenter S, O'Neill LA. How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses? *Cell Microbiol.* 2007;9:1891–901.
- Carvalho EM, Bacellar O, Barral A, Badaro R, Johnson WD Jr. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. *J Clin Invest* 1989; 83(3):860-4.
- Carvalho EM, Badaró R, Reed SG, Jones TC, Johnson WD Jr. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest* 1985; 76(6):2066-9.
- Carvalho EM, Teixeira RS, Johnson WD Jr. Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. *Infect Immun* 1981; 33: 498-500.
- Carvalho LP, Passos S, Dutra WO, Soto M, Alonso C, Gollob KJ, Carvalho EM, Ribeiro de Jesus A. Effect of LACK and KMP11 on IFN- $\gamma$  production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Scand J Immunol* 2005; 61(4):337-42.
- Chandra D, Naik S. *Leishmania donovani* infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. *Clin Exp Immunol* 2008; 154(2):224-34.
- Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH. MAP kinases. *Chem. Rev.* 2001; 101:2449-2476.
- Coelho-Finamore, V.C. Freitas, R.R. Assis, M.N. Melo, N. Novozhilova, N.F. Secundino, P.F. Pimenta, S.J. Turco, R.P. Soares, *Leishmania infantum*: lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts, *Int J Parasitol* 2011; 41:333–342.
- Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol* 2002; 72: 132-41.
- de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, Handman E, Schofield L. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2822-31.
- Dekrey GK, Lima HC, Titus RG. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun* 1998;66(2):827-9.

Dermine JF, Scianimanico S, Privé C, Descoteaux A, Desjardins M. Leishmania promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis, *Cell Microbiol* 2000;2:115–126.

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

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

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

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

Flandin JF, Chano F, Descoteaux A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon- $\gamma$ -primed macrophages. *Eur J Immunol* 2006;36(20): 411–420.

Frankenburg S, Leibovici V, Mansbach N, Turco SJ, Rosen G. Effect of glycolipids of *Leishmania* parasites on human monocyte activity. Inhibition by lipophosphoglycan, *J Immunol* 1990; 145: 4284–4289.

Gazzinelli RT, Ropert C, Campos MA. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol Ver* 2004;201:9-25.

Giorgione JR, Turco SJ, Epand RM. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11634–11639.

Griess Reagent System: technical bulletin (Part# TB22). Revisado 06/2009. Disponível em: <<http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/Griess%20Reagent%20System%20Protocol.ashx>>. Acesso em: 22 dez. 2011.

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

Grimaldi G Jr, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Ver* 1993; 6(3): 230-50.

Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceição-Silva F, Saraiva EM. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(16):6748-53.

Häcker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6. *J Exp Med* 2000; 192, 595-600.

Hatzigeorgiou DE, Geng J, Zhu B, Zhang Y, Liu K, Rom WN, Fenton MJ, Turco SJ, Ho JL. Lipophosphoglycan from *Leishmania* suppresses agonist-induced interleukin 1 beta gene expression in human monocytes via a unique promoter sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14708–14713.

Hawn TR, Ozinsky A, Underhill DM, Buckner FS, Akira S, Aderem A. *Leishmania* major activates IL-1 alpha expression in macrophages through a MyD88-dependent pathway. *Microbes Infect* 2002 Jul;4(8):763-71.

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor-5. *Nature* 2001; 410:1099±1103.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *The Lancet* 1999; 354: 1191-9.

Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 2005;433:523–7

Holaday BJ, Pompeu MM, Evans T, Braga DN, Texeira MJ, Sousa Ade Q, Sadick MD, Vasconcelos AW, Abrams JS, Pearson RD, et al. Correlates of *Leishmania* specific immunity in the clinical spectrum of infection with *Leishmania chagasi*. *J Infect Dis* 1993;167(2):411-7.

Holzmuller P, Bras-Gonçalves R, Lemesre JL.. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. *Parasitol* 2006; 132:S19–S32.

Hu X, Herrero C, Li WP, Antoniv TT, Falck-Pedersen E, Koch AE, Woods JM, Haines GK, Ivashkiv LB. Sensitization of INF- $\gamma$  Jak-STAT signalling during macrophages activation. *Nat Immunol* 2002; 3: 859-866.

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

Iwaki D, Nishitani C, Mitsuzawa H, Hyakushima N, Sano H, Kuroki Y. The CD14 region spanning amino acids 57-64 is critical for interaction with the extracellular Toll-like receptor 2 domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328: 173–6.

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197–216.

Junghae M, Raynes JG. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates *Leishmania donovani* infection in macrophages. *Infect Immun* 2002; 70:5026–5035.

Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999; 11:115±122.

Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ.* 2006;13: 816–825.

Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* 2011;9(8):604-15.

Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, Lee G, Choi S. Toll-like receptor signal transduction. *Exp Mol Med* 2007;39(4):421-38.

Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazzi S, Galanos C, Smith DF, Müller I. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun* 2004;72:1920–8.

Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001;81:807-869.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259):680-5.

Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:811-827.

Lauw FN, Caffrey DR, Golenbock DT. Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin *Trends Immunol.* 2005;26:509-511.

Liew FY, Wei XQ, Proudfoot L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1997 ;352(1359):1311-5.

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

Makhatadze NJ. Tumor Necrosis Factor Locus: Genetic Organisation and Biological Implications. *Hum Immunol* 1998;59:571–579.

Martiny A, Meyer-Fernandes JR, de Souza W, Vannier-Santos MA. Altered tyrosine phosphorylation of ERK1 MAP kinase and other macrophage molecules caused by *Leishmania amastigotes*. *Mol Biochem Parasitol* 1999; 102(1):1-12.

Matte C, Maion G, Mourad W, Olivier M. *Leishmania donovani*-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis. *Parasite Immunol* 2001; 23:177–184.

McConville MJ, Blackwell JM. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J Biol Chem* 1991; 266:15170–15179.

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

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

- McConville MJ, Turco SJ, Ferguson MAJ, Sacks DL. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *Eur Mol Biol Organ J* 1992; 11(10): 3593-3600.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997;9:4-9.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA Jr. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signalling pathways. *Mol Cell* 1998; 2(2): 253-258.
- Miggin SM, O'Neill LA. New insights into the regulation of TLR signalling. *J Leukoc Biol* 2006;80:220-226.
- Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Rev Immunol* 2008;8: 958-969.
- Mosser DM, Zhang X. Activation of Murine Macrophages. *Curr Protoc Immunol* 2008 Capitulo14:Unidade 14.2, 9 p.
- Muraille E, De Trez C, Brait M, De Baetselier P, Leo O, Carlier Y. Genetically resistant mice lacking MyD88-adaptor protein display a high susceptibility to *Leishmania major* infection associated with a polarized Th2 response. *J Immunol* 2003;170(8): 4237-4241.
- Muzio M, Mantovani A. Toll-like receptors. *Microbes Infect.* 2000;2:251-5.
- Nandan D, Lo R, Reiner NE. Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signalling and inhibits c-FOS and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 1999; 67:4055-4063.
- Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signalling point of view. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:293-305.
- O'Neill LA, Fitzgerald KA, Bowie AG. The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol.* 2003;24:286-290.
- Orlandi PA Jr, Turco SJ. Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Biol Chem.* 1987; 262(21):10384-91.
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:13766-71.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrinol Rev* 2001;22:153-183.

Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 2008; 321:970-4.

Piedrafita D, Proudfoot L, Nikolaev AV, Xu D, Sands W, Feng GJ, Thomas E, Brewer J, Ferguson MA, Alexander J, Liew FY. Regulation of macrophage IL-12 synthesis by *Leishmania* phosphoglycans. *Eur J Immunol* 1999; 29: 235–244.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science* 1998;282:2085-88.

Privé C, Descoteaux A. *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naïve macrophages. *Eur J Immunol* 2000; 30(8): 2235–2244.

Proudfoot L, Nikolaev AV, Feng GJ, Wei WQ, Ferguson MA, Brimacombe JS, Liew FY. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:10984–10989.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007;7(9):581-96.

Rogers ME, Kropf P, Choi B, Podinovskaia M, Bates P, Muller I. Proteophosphoglycan regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L arginine metabolism of host macrophage to promote parasite survival. *PLoS Pathog* 2009; 5(8):1-14.

Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*. 2002 Nov;2(11):845-58.

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

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

Salmon RA, Guo X, Teh HS, Schrader JW. The p38 mitogen-activated protein kinases can have opposing roles in the antigen-dependent or endotoxin-stimulated production of IL-12 and IFN- $\gamma$ . *Eur J Immunol* 2001; 31(11): 3218–3227.

Schnare M, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Recognition of CpG DNA is mediated by signalling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr Biol* 2000;10:1139-1142.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Júnior G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984;79(4):511.



Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. Immunopathogenic competences of *Leishmania* (V.) *braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2009; 31(8):423-31.

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

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

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

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2002;1:335–376.

Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signalling cascades. *Int Immunol* 2000; 12:113±117.

Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Rev Immunol* 2003; 3(2): 133–146.

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

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

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

Van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 2004; 173:6521-5.

Vargas-Inchaustegui DA, Tai W, Xin L, Hogg AE, Corry DB, Soong L. Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice. *Infect Immun* 2009;77(7):2948-56.

Vivarini de C, Pereira Rde M, Teixeira KL, Calegari-Silva TC, Bellio M, Laurenti MD, Corbett CE, Gomes CM, Soares RP, Silva AM, Silveira FT, Lopes UG. Human cutaneous leishmaniasis: interferon-dependent expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) via TLR2. *Faseb J.* 2011;25(12):4162-73.

Watford WT, Hissong BD, Bream JH, Kanno Y, Muul L, O'Shea JJ. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol Rev* 2004; 202: 139–156.

Werneck GL. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. *Cad Saude Publica* 2008; 24:2937-2940.

World Health Organization, 2010. Leishmaniasis: background information. Disponível em: <[www.who.int/leishmaniasis/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/en/)>. Acesso em: 12 dez. 2011.

Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 2005;308:1626-1629.

Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S. A Toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004;303:1522-1526.