

Figura 37. Efeito da AbA nas formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*

Formas amastigotas ($\sim 1,2 \times 10^6$) foram isoladas de lesões de patas de hamsters e incubadas em meio LIT com diferentes concentrações do inibidor (1, 4 e 10 μM) a 37°C. Após 24 horas, foi realizada uma contagem de parasitas viáveis.

* Valores significativos de experimentos em duplicata \pm desvio padrão da média. Análise por *t*-Teste, significância para $p < 0,05$ em relação ao controle.

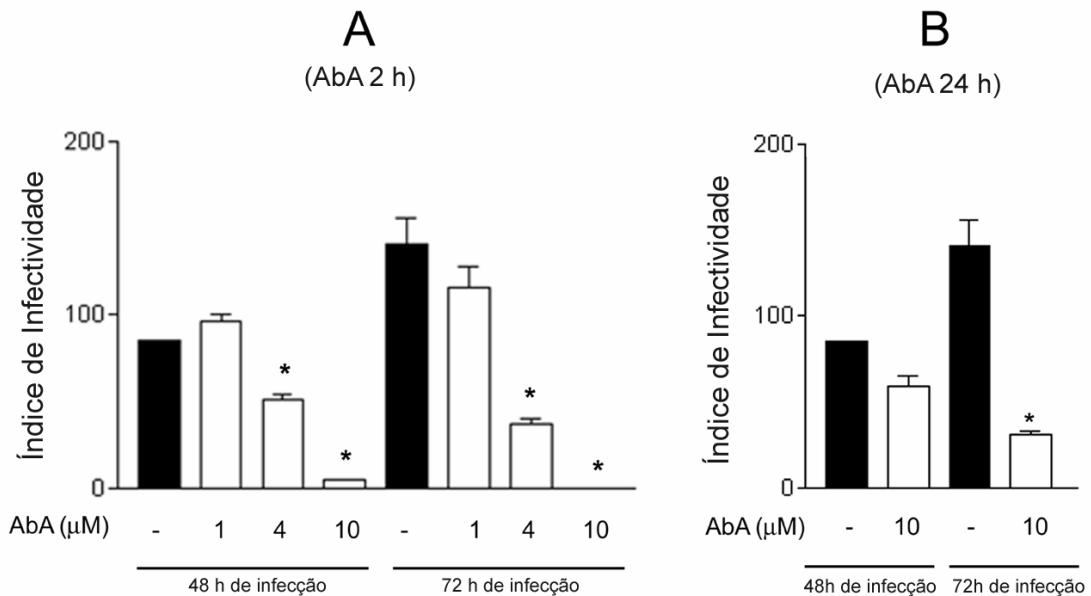


Figura 38: Efeito da AbA em cultura de macrófagos infectados com formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*

Culturas de macrófagos foram infectadas com formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Foram realizados dois experimentos paralelos, em um o tratamento com AbA iniciou-se após as 2 horas de infecção (AbA 2h - painel A) e outro, após 24 horas de infecção (AbA 24h - painel B). O índice fagocítico foi calculado 48 e 72 horas após o tratamento.

* Valores significativos de experimentos realizados em triplicata \pm desvio padrão da média. Análise pelo *t*-Teste, nível de significância para $p < 0,05$ em relação aos controles (ausência de AbA).

Tabela 3

**Efeito da AbA na infectividade de formas amastigotas de
*L. (L.) amazonensis***

Análise após 48 horas de infecção

Ensaio	Amastigota por macrófago	Porcentagem de macrófagos com <i>Leishmania</i>
AbA 2h - 1 μ M	1,91 \pm 0,13	55,00 \pm 7,07
AbA 2h - 4 μ M	1,46 \pm 0,27	31,50 \pm 2,12*
AbA 2h - 10 μ M	1,00 \pm 0,00*	4,55 \pm 0,07*
AbA 24h - 10 μ M	1,50 \pm 0,07	39,00 \pm 4,24
Controle	1,81 \pm 0,11	47,00 \pm 2,83

Análise após 72 horas de infecção

Ensaio	Amastigota por macrófago	Porcentagem de macrófagos com <i>Leishmania</i>
AbA 2h - 1 μ M	2,01 \pm 0,18	57,00 \pm 4,24
AbA 2h - 4 μ M	1,31 \pm 0,08*	30,25 \pm 2,47*
AbA 2h - 10 μ M	1,00 \pm 0,00*	1,90 \pm 1,56*
AbA 24h - 10 μ M	1,51 \pm 0,08*	30,00 \pm 1,41*
Controle	2,47 \pm 0,18	57,00 \pm 4,38

AbA 2h: culturas de macrófagos infectados cujo tratamento com a AbA iniciou-se 2 horas após a infecção.

AbA 24h: culturas de macrófagos infectados cujo tratamento com a AbA iniciou-se 24 horas após a infecção.

* Valores significativos de experimentos em duplicata \pm desvio padrão da média. Análise por *t*-Teste, significância para $p < 0,05$ em relação ao controle (sem droga).

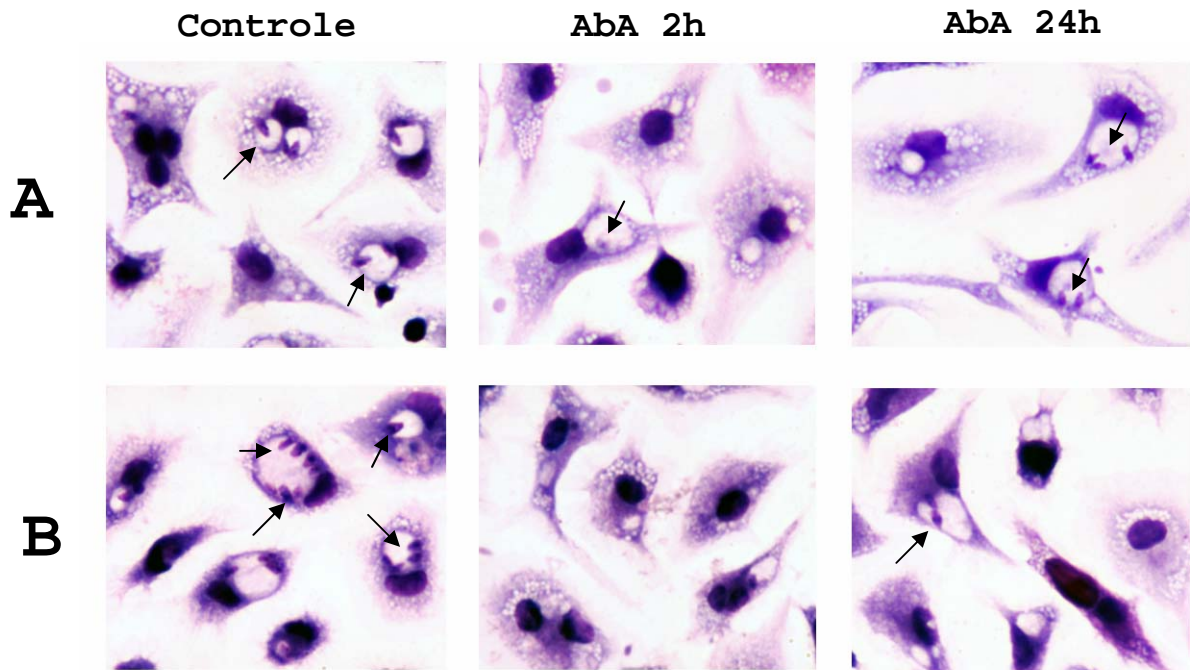


Figura 39. Fotomicrografia de cultura de macrófagos murinos infectados com formas amastigotas de *(L.) (L.) amazonensis* tratados com AbA

Culturas de macrófagos foram infectadas com formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e tratadas com AbA, utilizando-se dois protocolos: um tratamento com AbA iniciado após 2 horas de infecção (AbA 2h) e outro, após 24 horas de infecção (AbA 24h). As lamínulas foram fixadas, coradas com Hema 3, conforme descrito em Métodos, e examinadas ao microscópio óptico. As setas indicam os parasitas.

Painel A: Células analisadas após 48 h de infecção.

Painel B: Células analisadas após 72 h de infecção.

essa diminuição foi significativa somente 48 horas após o início do tratamento (figura 38B). Essa diminuição está relacionada com o menor número de parasitas intracelulares (tabela 3), indicando que a AbA é internalizada no macrófago, sendo capaz de atuar nas formas de *L. (L.) amazonensis*.

4.4. Efeito da AbA na diferenciação amastigota-promastigota de *L. (L.) amazonensis*

Com intuito de estudar o efeito dos inibidores de síntese de esfingolipídeos durante a diferenciação amastigota-promastigota, formas amastigotas isoladas de lesão foram colocadas em meio LIT na presença da AbA e mantidas a 23°C. Os parasitas foram observados diariamente ao microscópio e contabilizados. Os resultados mostraram que a AbA (10 µM) foi letal para as formas amastigotas. No entanto, cabe salientar que os parasitas remanescentes do tratamento são capazes de se diferenciar, mas não são capazes de crescer normalmente, confirmando os resultados anteriores, os quais mostraram que as formas promastigotas não crescem na presença da AbA (figura 40). Estes resultados sugerem que a AbA não atua na diferenciação propriamente dita, mas sim nas próprias formas amastigotas no início do ensaio, e nas formas promastigotas presentes a partir do 4º dia, impedindo-as de dividir.

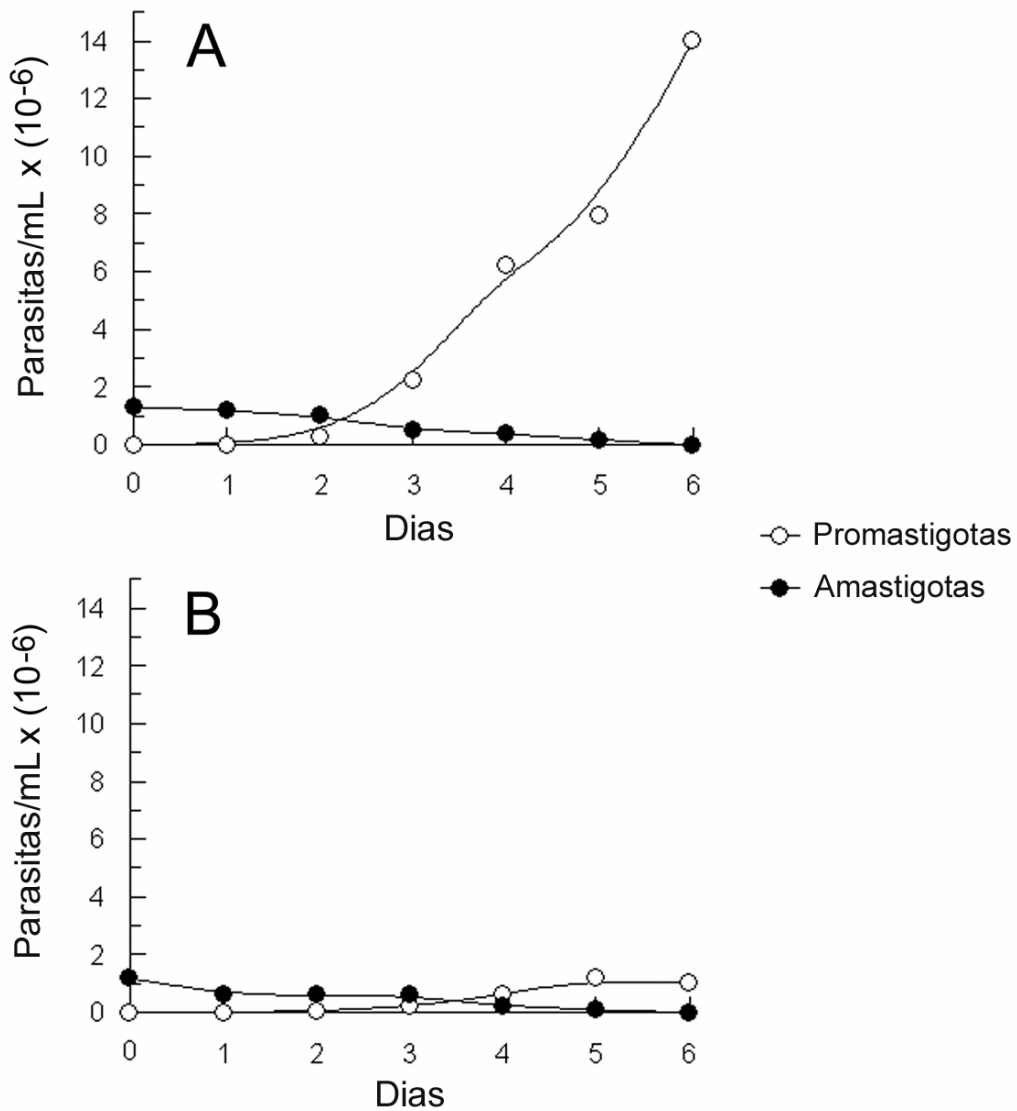


Figura 40. Efeito da AbA na diferenciação amastigota-promastigota de *L. (L.) amazonensis*

Formas amastigotas (1×10^6) recém-isoladas de lesão foram cultivadas em meio LIT contendo $10 \mu\text{M}$ de AbA a 23°C . Diariamente foram coletadas alíquotas do meio para contagem de amastigotas e promastigotas. Painel **A**, controle (ausência de droga); Painel **B**, parasitas tratados com AbA.

5.5. Efeito da AbA na marcação metabólica de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* com serina tritiada

Como descrito anteriormente, a AbA inibe o crescimento das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Com intuito de analisar se a síntese de lipídeos poderia estar sendo afetada pela presença de AbA foi realizado um estudo de marcação com serina tritiada, uma vez que a serina é um precursor da via de biossíntese de esfingolipídeos (IPC, esfingomiéline e glicosfingolipídeos).

O presente estudo mostrou que o perfil incorporação de serina no extrato lipídico dos parasitas tratados com AbA foi diferente dos parasitas controles, sendo observada uma diminuição da expressão de ceramida e de um composto com migração cromatográfica similar ao inositol fosforilceramida de *Saccharomyces cerevisiae*, e aumento de expressão de um componente não identificado, todos resistentes ao tratamento alcalino com KOH (figura 41). Para confirmação da expressão de IPC em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, os lipídeos foram extraídos com solvente orgânico como descrito em Matérias e Métodos e purificação por coluna de DEAE-Sephadex, HPTLC preparativa e o composto com migração de IPC foi analisado por GC-MS após derivatização com Tri-Sil. Os resultados mostraram que esse composto que cora com azul de molibdênio (apresentando, portanto, ligação fosfodiéster) é constituído por inositol, esfingosina (d18:1) e ácido graxo contendo 18 e 16 carbonos (C18:0 e C16:0, dados não mostrados).

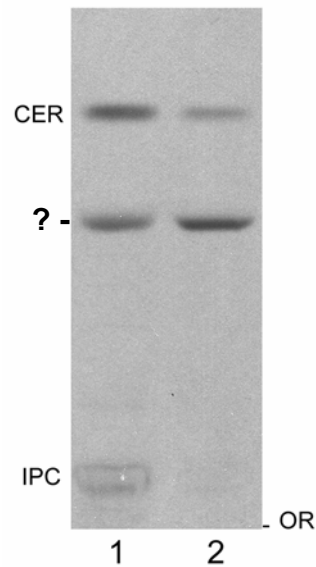


Figura 41. Perfil cromatográfico do material extraído com solvente IPA:hexano:água das formas promastigotas marcadas com serina tritiada na presença de AbA

Cerca de 5×10^7 parasitas foram marcados com serina tritiada na presença ou não da AbA por 8 horas a 23°C . Após esse período os parasitas foram extraídos com mistura de solvente IPA/hexano/água, tratados com KOH e analisados por auto-radiografia em placas de HPTLC desenvolvidas no sistema de solvente B, como descrito em Métodos.

Linha 1. Parasitas controle (ausência de AbA).

Linha 2. Parasitas tratados (presença de AbA).

DISCUSSÃO

A leishmaniose representa um grande problema na área de saúde no Brasil. O aumento gradual dessa doença e sua recente associação com a AIDS torna ainda mais importante o estudo bioquímico dos mecanismos de interação da *Leishmania* com as células do hospedeiro vertebrado.

Os estudos de antígenos do parasita que apresentam papel relevante para o sucesso da colonização da *Leishmania*, tanto no inseto vetor como em macrófagos, indicam que glicoconjugados complexos podem exercer papel fundamental no processo de infecção (Naderer e cols., 2004).

1. Proteofosfoglicanos, lipofosfoglicanos e glicosfingolipídeos de *L. (L.) amazonensis*

Os fosfoglicanos têm sido implicados como fatores de virulência das *Leishmania* nas células do hospedeiro vertebrado, e como compostos cruciais para o desenvolvimento e sobrevivência no inseto vetor. Os fosfoglicanos de *Leishmania* podem ser encontrados: **i)** como cadeias livres de fosfoglicanos secretados; **ii)** ligados a um "core" glicolipídico em lipofosfoglicanos (LPGs); e **iii)** ligados a proteínas secretadas ou associadas à membrana do parasita, coletivamente denominados proteofosfoglicanos (PPGs).

Observações anteriores realizadas no nosso laboratório mostraram que os mAbs ST-3 e ST-4, dirigidos a glicosfingolipídeos (GSLs) de formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, além de reconhecerem os amastigotas intracelulares, apresentavam uma forte fluorescência no interior do fagossoma, sugerindo que os amastigotas liberam/secretam componentes reconhecidos por esses mAbs,

dentro do vacúolo parasitóforo (Tanaka e colaboradores, 2002). Os estudos de PPGs secretados por *Leishmanias* têm sido focalizados em *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana*. Com base em nossos resultados, e com intuito de estender o estudo de PPGs a outras espécies de *Leishmania*, analisamos a presença de PPGs liberados para o meio de cultura ou liberados para o vacúolo parasitóforo em *L. (L.) amazonensis*, uma das espécies responsáveis pela leishmaniose cutânea no Novo Mundo, particularmente no Brasil.

Ensaaios de imunofluorescência indireta e imunoprecipitação com mAb ST-3, que reconhece GSLs em amastigotas e LPG em promastigotas, confirmaram que os promastigotas de *L. (L.) amazonensis* também secretam um componente de alto peso molecular que contém glicanas fosforiladas. A existência desse fosfoglicano era apenas sugerida pela característica comum de promastigotas de *Leishmania* formarem agregados (em forma de rosáceas) em meio de cultura. O PPG filamentososo de *L. (L.) major* foi inicialmente identificado pela presença de uma rede de filamentos fibrosos nessas rosáceas, observada por microscopia eletrônica (Stierfof e cols., 1994, Ilg e cols., 1996). O presente trabalho mostrou que o pPPG secretado pela *L. (L.) amazonensis* apresenta alto peso molecular permanecendo no gel de empacotamento em SDS-PAGE descontínuo e tem aspecto polidisperso visualizado por "Western blotting", semelhante aos PPGs descritos para *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) major* (Ilg, 2000). Os mAbs ST-3, ST-5 e VST-1 apresentaram reatividade com os pPPGs secretados, sugerindo que essas moléculas apresentam epítomos carboidratos comuns aos GSLs e LPGs.

Na literatura há descrições de grandes quantidades de PPGs secretados por amastigotas de *L. (L.) mexicana* no vacúolo parasitóforo, que podem ser liberados para o tecido após ruptura das células infectadas (Ilg e cols., 1996). Com

intuito de averiguar a existência de material similar secretado por amastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram realizados estudos imunohistoquímicos de lesões de hamsters infectados com esse parasita. Os resultados mostraram que os amastigotas secretam um componente localizado no vacúolo parasitóforo, visualizado mesmo após delipidação das lesões com mistura de solvente orgânico, que elimina a reatividade dos mAbs com os GSLs. A purificação e caracterização imunológica mostrou que o PPG secretado por amastigotas também apresenta alto peso molecular. Por "Western blotting" foi verificado que os mAbs ST-3, ST-4 e ST-5 são reativos com o material localizado no topo do gel, e o mAb VST-1 não é reativo com este material, contrastando com os resultados obtidos para o pPPG. Essas diferenças podem estar relacionadas com as diferenças estruturais dos PPGs de promastigotas e amastigotas. A análise da composição carboidrato dos pPPGs de *L. (L.) amazonensis* por GC/MS mostrou a presença de manose:galactose:glucose, na proporção molar de 1:1,2:1,7; já em aPPGs foi detectada uma maior proporção de glucose, sendo observada a presença de manose:galactose:glucose na proporção de 1:2:9. Esses dados são distintos daqueles observados em formas promastigotas de *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana* (Ilg, 2000) que relataram a presença de fosfoglicanos contendo manose, galactose e arabinose na proporção molar de 1,5:1:0,25, e manose e galactose e glucose na proporção de 1,5~4:1:0,5, respectivamente. Em amastigotas de *L. (L.) mexicana* foi detectada a proporção molar de manose:galactose:glucose de 1,5:1:1 (Ilg e cols, 1995). As diferenças observadas em relação à composição dos PPGs secretados por *L. (L.) amazonensis* e outras *Leishmanias* podem estar relacionadas com a expressão de glicosiltransferases espécie-específicas.

Os LPGs e os PPGs possuem cadeias oligossacarídicas comuns e estudos realizados com PPG e LPG de *L. (L.) major*

mostraram que esses compostos são capazes de se ligarem a macrófagos, mas não à células epiteliais ou fibroblastos (Piani e cols., 1999). Os resultados obtidos com pPPG purificado de meio de cultura de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* são similares aos de *L. (L.) major*, tendo sido demonstrado que o pPPG isolado de *L. (L.) amazonensis* também se liga ao macrófago. Piani e colaboradores (1999) verificaram que o PPG quando incubado com macrófagos é internalizado, sendo detectado em compartimentos lisossomais. Além disso, compostos polianiônicos, como os PPGs, são capazes de provocar vacuolização da célula fagocítica (Peters e cols., 1997b). No presente estudo observamos que os pPPGs secretados por formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* também são capazes de se ligarem ao macrófago, apresentando co-localização com marcadores de vesículas acídicas. Peters e colaboradores (1997b) mostraram que PPGs secretados por formas amastigotas de *Leishmanias* do complexo mexicana são capazes de formar pequenos vacúolos que podem contribuir na expansão, espécie-específica, dos fagolisossomas. Os resultados obtidos nesta tese sugerem a possibilidade dos pPPGs auxiliarem na formação e expansão compartimentos fagolisossomais no processo de infecção por formas promastigotas de *Leishmania*.

No momento da interação do parasita com a célula hospedeira, a ativação dos macrófagos é considerada o mecanismo primário para a eliminação da *Leishmania* mediada pela produção de metabólitos de oxigênio como óxido nítrico, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (Assreuy e cols., 1994). Os macrófagos ativados são capazes de produzir uma variedade de citocinas como as interleucinas e fator de necrose tumoral (TNF- α). Por exemplo, a interleucina-12 produzida por macrófagos pode direcionar a diferenciação e proliferação das células Th1, induzindo a produção de gama interferon (INF- γ), que por sua vez ativa a síntese de NO do

macrófago, visando a eliminação do parasita (Liew e O'Donnell, 1993). Entretanto, no caso da fagocitose das *Leishmanias*, os macrófagos são subvertidos em sua capacidade microbicida, sendo assim os parasitas sobrevivem e se multiplicam no interior dessas células.

A produção de óxido nítrico é considerada um importante mecanismo efetor para eliminação de *Leishmania*. Wei e colaboradores (1995) mostraram que camundongos mutantes da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) são incapazes de controlar a infecção e seus macrófagos também são incapazes de eliminar formas promastigotas. Por outro lado, há estudos mostrando que os parasitas *per se*, ou seus componentes de superfície podem modular de modo positivo ou negativo a produção de iNOS pelo INF- γ , dependendo das condições do estímulo. Por exemplo, macrófagos infectados ou macrófagos não infectados, porém pré-expostos a LPGs e GIPLs de *Leishmania* perdem a habilidade de induzir iNOS ou de gerar NO em resposta ao INF- γ e/ou ao lipopolissacarídeo (Proudfoot e cols., 1995, 1996). Já, macrófagos pré-incubados com INF- γ e, posteriormente, expostos a LPGs e/ou a PPGs são capazes de estimular a produção de NO (Proudfoot e cols., 1996; Piani e cols., 1999).

No presente estudo, analisamos o efeito de LPGs, pPPGs, aPPGs e GSLs de *L. (L.) amazonensis* quanto a modulação da produção de NO e de fator de necrose tumoral alfa. Os resultados obtidos com LPGs e pPPGs de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* confirmam dados da literatura, onde macrófagos estimuladas com esses antígenos não são capazes de induzir a produção de NO. Entretanto, as células incubadas na presença concomitante do LPG ou PPG com INF- γ foram capazes de produzir NO de maneira dose-dependente. O LPG e o PPG *per se* não estimulam a produção de TNF- α porém quando presentes em altas concentrações são capazes de inibir a produção dessa citocina induzida por lipopolissacarídeo de

bactéria. Esses resultados corroboram a noção de que esses glicoconjugados podem modular a ativação dos macrófagos, etapa fundamental para o estabelecimento inicial da infecção por formas promastigotas de *Leishmania*. Além disso, o fato desses antígenos não serem capazes de elicitar a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , responsável pelo recrutamento de células inflamatórias (como neutrófilos, monócitos/macrófagos) ao local da infecção, favorece a sobrevivência do parasita. No entanto, em uma fase posterior da infecção, havendo estímulo do macrófago por citocinas derivadas de células T, como o INF- γ , esses glicoconjugados podem modular positivamente na morte do parasita através da produção de NO. Entretanto, as formas amastigotas da *L. (L.) amazonensis* responsáveis pela manifestação clínica da doença no hospedeiro vertebrado, não expressam glicoconjugados como LPGs e pPPGs, e sim GSLs e aPPGs. Dessa maneira, o presente estudo também avaliou o efeito dos aPPGs e dos GSLs de formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* na produção de NO e TNF- α por macrófagos peritoneais *in vitro*. Aebischer e colaboradores (1999) demonstraram que o PPG secretado por formas amastigotas de *L. (L.) mexicana* é pouco imunogênico, não elicitando a produção de anticorpos ou liberação de citocinas. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que o aPPG de *L. (L.) amazonensis per se* é capaz de estimular a produção de NO. Além disso, foi observado que macrófagos estimulados com GSLs não produzem NO, mesmo na presença de INF- γ , sugerindo que durante a infecção, mesmo ocorrendo ativação do macrófago por citocinas, o parasita que expressa antígenos glicosfingolipídicos seria capaz de sobreviver, suprimindo a produção de radicais microbicidas como o NO. Os GSLs não são capazes de induzir a produção de TNF- α e inibem a produção de TNF- α induzida por lipopolissacarídeo, sugerindo que os GSLs de formas amastigotas de *L. (L.)*

amazonensis poderiam modular negativamente a resposta inflamatória durante a infecção.

Os resultados discutidos acima estimularam a continuidade do estudo do papel dos glicoconjugados *L. (L.) amazonensis*, com enfoque no papel biológico dos GSLs e dos PPGs secretados por formas promastigotas e amastigotas na produção de radicais microbicidas, uma vez que os mecanismos envolvidos na sobrevivência da *L. (L.) amazonensis* na célula hospedeira ainda não estão bem definidos. Como já mencionado anteriormente, os glicoconjugados podem modular a atividade do macrófago de maneiras diferentes; enquanto os LPGs, *p*PPGs e GSLs não induzem a produção de NO, o *a*PPG pode induzi-la. O efeito da estimulação concomitante de GSLs e *p*PPGs/*a*PPGs na produção de óxido nítrico pelo macrófago foi também analisado. Foi observado que os GSLs neutros totais e GSLs neutros não reativos com mAb ST-3 (esse último em menor grau; fração constituída de CMH, CDH e CTH, também expressos em macrófagos não infectados) foram capazes de inibir a produção de NO estimulado pela presença de *a*PPG, *a*PPG/INF- γ e *p*PPG/INF- γ . Estudos têm mostrado que os GSLs podem regular a transdução de sinal através de receptores associados a proteína quinase C (PKC) (Hannun e Bell, 1989; Hakomori e Igarashi, 1995). Além disso, já foi demonstrado que os GSLs de formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* são capazes de modular negativamente a atividade da PKC (Giorgio e cols., 2003). Os resultados do presente estudo podem corroborar a hipótese de que os GSLs de formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* poderiam atuar como moléculas de sinalização, modulando a resposta imune durante o processo infeccioso da leishmaniose.

2. Expressão de antígenos glicolipídicos em amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e localização dos glicolipídeos em DRMs

As formas amastigotas da *Leishmania* são responsáveis pela manifestação clínica da doença no hospedeiro vertebrado. Entretanto, a maioria das informações acerca dos sistemas metabólicos e moleculares da *Leishmania* é de formas promastigotas.

Nosso laboratório demonstrou que amastigotas de *L. (L.) amazonensis* isolados de animais infectados expressam antígenos GSLs, reconhecidos por mAbs específicos. Essas moléculas não são adquiridas da célula hospedeira (Straus e cols., 1993, 1995, 1997), ao contrário dos GSLs descritos em amastigotas de *L. (L.) donovani* (McConville e Blackwell, 1991) e *L. (L.) mexicana* (Winter e cols., 1994), que são incorporados da célula hospedeira. A dificuldade de se obter amastigotas de lesão em quantidade, e livre de contaminantes do hospedeiro gerou estudos para o desenvolvimento e estabelecimento de culturas de amastigotas axênicos de *Leishmania*. Embora vários critérios como a similaridade morfológica, infectividade, expressão de antígenos estágio-específicos e outros venham sendo aplicados para o estabelecimento dos amastigotas axênicos (Gupta e cols., 2001), os resultados do presente estudo mostraram que existem diferenças no perfil glicolipídico em relação aos amastigotas isolados de lesão. Amastigotas axênicos apresentam somente glicolipídeos com baixa migração cromatográfica em HPTLC. Já os amastigotas de lesão apresentam um perfil cromatográfico mais complexo de glicolipídeos, constituído desde estruturas mais simples como CMH, CDH, CTH e globosídeo (também presentes em macrófagos) a estruturas com cadeias mais longas de carboidratos. Em ensaios de imunocoloração em placas de HPTLC utilizando mAbs ST-3, ST-4 e ST-5, que reconhecem especificamente GSLs de formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* isolados de lesão, observamos que esses mAbs não apresentam reatividade com glicolipídeos de formas axênicas. Por imunofluorescência indireta observamos que a reatividade

dos anticorpos anti-GSLs ST-3, ST-4 e ST-5 em amastigotas axênicos é intracelular, diferentemente da forte marcação de superfície observada em amastigotas isolados de lesão. Por outro lado, o mAb VST-1, que reconhece LPG expresso em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, não é reativo tanto com amastigotas axênicos, quanto com os amastigotas isolados de lesão. Esses resultados confirmam estudos anteriores (McConville e Blackwell, 1991; Saar e cols., 1989) que descreveram uma diminuição da expressão das moléculas de LPG tanto em formas amastigotas isoladas de lesão quanto de amastigotas axênicos. Estudos realizados por Peder e colaboradores (2006) utilizando o mAb LST-2 produzido contra GIPLs de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* mostraram que esse mAb reconhece os amastigotas axênicos, mas não os amastigotas isolados de lesão, sugerindo que há diferenças de expressão de GSLs e GIPLs entre essas formas. Além disso, trabalho recente realizado por Holzer e colaboradores (2006) demonstrou que a expressão gênica nas formas amastigotas axênicas é distinta de amastigotas de lesão e também de formas promastigotas. Os dados obtidos nesta tese reforçam a noção de que há diferenças bioquímicas entre amastigotas axênicos e amastigotas isolados de lesão, e que há necessidade de mais estudos para avaliação da aplicabilidade de amastigotas axênicos como modelo de estudo, uma vez que essas formas não são capazes de mimetizar, em absoluto, os amastigotas intracelulares em razão da complexidade do meio em que se encontram os parasitas no hospedeiro vertebrado.

Uma vez verificada essa diferença na expressão de glicoconjugados nas formas amastigotas e promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, foi analisada a localização desses (glico)lipídeos na membrana dos parasitas. As membranas biológicas são constituídas por diferentes proteínas e espécies de lipídeos como os glicerolipídeos, esfingolipídeos e colesterol. Os glicerolipídeos e esfingolipídeos estão

assimetricamente distribuídos na camada extracelular e intracelular da membrana plasmática. Apesar dos lipídeos da membrana apresentarem alta fluidez, eles podem se organizar lateralmente na bicamada lipídica, formando microdomínios ou "rafts" ricos em esfingolipídeos e colesterol que podem estar envolvidos em numerosas funções celulares como tráfego de membranas/vesículas, morfogênese e sinalização celular (Simons e Ikonen 1997). Esses microdomínios formam complexos insolúveis em Triton X-100 a 4°C (Brown e Rose, 1992). Trabalhos recentes têm demonstrado que os DRMs podem ser isolados tanto em *Leishmania* quanto em *Trypanosoma brucei* (Nolan e cols., 2000; Denny e cols., 2001, 2004; Ralton e cols., 2002; Zufferey e cols., 2003). No presente estudo foram analisados os DRMs em formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Em uma primeira análise, foram realizadas extrações dos parasitas com Triton X-100 em diferentes temperaturas. Os resultados mostraram claramente que a maior parte dos GSLs não é extraída a 4°C, mas completamente solubilizada a 37°C, sugerindo, então, que os GSLs estão segregados nesses microdomínios resistentes ao detergente. A fração insolúvel ao detergente não-iônico em baixa temperatura mostrou-se enriquecida de GSLs, esfingomielina e esteróis, apresentando também pequena quantidade de fosfolipídeos, de maneira análoga aos "rafts" lipídicos de mamíferos e de fungos. Além disso, foi verificado que na fração solúvel os fosfolipídeos apresentam preferencialmente ácidos graxos insaturados, enquanto na fração insolúvel está enriquecida de ácidos graxos saturados, o que é consistente com o modelo de longas cadeias de hidrocarboneto saturadas presentes nos DRMs (Parton e Simons, 1995). Foi observado que as frações de baixa densidade de DRMs isoladas após ultracentrifugação em gradiente de sacarose são enriquecidas de GSLs, de esteróis, de esfingomielina. Estas frações apresentam também pequenas quantidades de fosfolipídeos como

a fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina, que está de acordo com a composição de microdomínios de membrana descrito por Simons e Ikonen (1997). Além disso, por "Western blotting" utilizando soro de camundongo infectado com *L. (L.) amazonensis*, foi observado a presença de uma proteína em torno de 50 kDa, encontrada somente nas frações insolúveis ao detergente não-iônico. A caracterização dessa proteína de formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* é de grande interesse, uma vez que estas regiões podem desempenhar várias funções na adesão e sinalização celular e por conseguinte, estarem relacionadas com o processo de interação com a célula hospedeira.

A presença de DRMs foi analisada em formas promastigotas procíclicas de *L. (L.) amazonensis*. Os resultados mostraram claramente que a maior parte dos glicolipídeos/glicoglicerolipídeos está presente na fração insolúvel ao Triton X-100 a 4°C, sugerindo, então, que os glicolipídeos em promastigotas estão segregados nesses microdomínios resistentes ao detergente. Nessas frações insolúveis ao detergente em baixa temperatura notou-se também a presença de inositol fosforilceramida, esteróis e fosfatidiletanolamina (em menor quantidade em relação à fração solúvel a 4°C). O LPG de formas promastigotas procíclicas foi detectado somente nas frações solúveis ao Triton X-100 nas extrações realizadas tanto a 4°C quanto a 37°C, provavelmente devido às cadeias *liso*-alquil da âncora lipídica. Estes dados também foram confirmados nos ensaios onde os DRMs foram isolados por ultracentrifugação em gradiente de sacarose. Por "Western blotting" utilizando soro de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*, foi observado a presença de uma proteína em torno de 46 kDa em todas as frações, que é reconhecida pelo soro. Vários autores descreveram a presença de uma proteína de 46 kDa denominada gp46/M-2 em *Leishmania*, envolvida na interação com macrófagos

e na resistência do parasita a lise mediada por complemento (Kedzierski e cols., 2004; Lincoln e cols., 2004). A localização de parte dessa glicoproteína nas frações insolúveis ao detergente pode reforçar o envolvimento dessas moléculas no processo de interação com a célula hospedeira.

Os dados obtidos neste estudo complementam vários outros trabalhos, demonstrando que os DRMs também podem ser isolados de formas amastigotas e promastigotas de *L. (L.) amazonensis* como frações de baixa densidade em gradiente de sacarose, que é característico de "rafts" lipídicos descritos em mamíferos e fungos. A presença inequívoca de GSLs em formas amastigotas e IPC/GIPLs em formas promastigotas nesses domínios pode estar relacionada com a capacidade desses domínios de interagirem (no processo de ligação e transdução de sinais) com as células do hospedeiro. Assim, passamos a avaliar a importância dos esfingolipídeos, mais especificamente na análise da via de biossíntese de esfingolipídeos em tripanossomatídeos como potencial alvo para estudos de drogas anti-parasitárias. Como os esfingolipídeos são constituintes ubíquos dos microdomínios de formas amastigotas e promastigotas, foi analisado o papel dessas moléculas utilizando-se um inibidor de biossíntese de inositol fosforilceramida, a Aureobasidina A.

3. Efeito de inibidor de inositol fosforilceramida sintase em *L. (L.) amazonensis*

Vários trabalhos mostram que os IPCs, ausentes em mamíferos, são sintetizados principalmente por fungos e plantas. No entanto, os IPCs também estão presentes em *Leishmania* (Singh e cols., 1988; De-Majumdar, 1992; Zhang e cols., 2003), e em *Trypanosoma cruzi* apresentando-se ligado um "core" de estruturas mais complexas formando

glicosilinositol fosforilceramidas (GIPCs) e âncoras ligadas a glicoproteínas (Lederkremer e cols., 2001). O uso de AbA em *Trypanosoma cruzi* tem mostrado que essa droga inibe a síntese de IPC e GIPCs, além de interferir na diferenciação de tripomastigotas em meio ácido (Salto e cols., 2003; Figueiredo e cols., 2005). Sonda e colaboradores (2005) demonstraram que *Toxoplasma gondii* tratados com AbA não são capazes de sintetizar esfingolipídeos, replicar *in vitro* e se diferenciar da forma taquizoíta para bradizoíta. Visando melhor compreensão do papel de esfingolipídeos e glicolipídeos em *Leishmania*, foi analisado o efeito da AbA sobre a *L. (L.) amazonensis*.

Em estudo com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com AbA, observou-se que essa droga é capaz inibir totalmente o crescimento dos parasitas. Após a retirada do inibidor do meio de cultura, o crescimento dos parasitas foi normalizado. Ensaio *in vivo* mostraram que os parasitas tratados com AbA levam a um estabelecimento tardio da infecção, mas, uma vez estabelecida, a lesão se desenvolve de maneira semelhante aos animais inoculados com *Leishmanias* não pré-incubadas com AbA. Ensaio de marcação, de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, com serina tritiada mostraram inibição da síntese de um composto com migração cromatográfica similar ao IPC e resistente à hidrólise alcalina quando os parasitas foram incubados na presença da AbA. O efeito tardio do estabelecimento da infecção observado no presente estudo pode ser, então, decorrente à diminuição da síntese/expressão de esfingolipídeos, que pode estar interferindo na re-localização de componentes cruciais para o processo de interação com a célula hospedeira. Estudos com *L. (L.) major* (Zhang e cols., 2003) utilizando parasitas mutantes no gene LmLCB2 (subunidade 2 da serino palmitoil transferase) sugerem que os esfingolipídeos não afetam o crescimento do parasita, entretanto parecem ser essenciais na

diferenciação de formas procíclicas para metacíclicas. Esses dados foram complementados por estudos realizados por Denny e colaboradores (2004), que demonstraram que estes parasitas, mutantes no gene *LmLCB2*, além do comprometimento na diferenciação, apresentam alterações nos processos de tráfego de membranas e infectividade. No entanto, no presente estudo, verificamos que a AbA interfere no crescimento da *L. (L.) major*, embora de maneira menos efetiva do que em *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

Ao contrário do observado para formas promastigotas, AbA 10 μM é tóxica para as formas amastigotas isoladas de lesão. Uma vez observado esse efeito da droga sobre as formas amastigotas extracelulares, analisou-se o efeito da AbA sobre cultura de macrófagos peritoneais de camundongos infectados com formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Foi observado, tanto em experimentos cujo tratamento iniciou-se 2 horas após a infecção como em experimentos cujo tratamento iniciou-se 24 horas após a infecção, uma diminuição significativa do índice fagocítico, acompanhado da queda do número de células infectadas e do número de parasitas intracelulares. A ação do inibidor sobre os parasitas foi efetiva em ambos os ensaios (tratamento iniciado após 2 horas ou após 24 horas de infecção).

Contrastando com os resultados do nosso laboratório, onde não se detectou IPC em formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, Zhang e colaboradores (2005) reportaram, em *L. (L.) major*, que tanto as formas amastigotas selvagens quanto os parasitas deficientes na síntese de esfingolipídeos apresentam altas quantidades de IPC ($\sim 1,3 \times 10^8$ moléculas por célula) e sugerem que os esfingolipídeos seriam moléculas importantes na sobrevivência do parasita dentro da célula hospedeira. Apesar de não termos detectado GIPCs e IPCs em formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, o IPC poderia estar presente em baixas concentrações e atuar como

intermediário importante, da via de biossíntese de esfingolipídeos, para a sobrevivência do parasita. Dessa maneira, pode-se sugerir que a AbA esteja provocando apoptose nas formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* devido ao acúmulo de metabólitos da via de biossíntese de esfingolipídeos, sem interferir, pelo menos de maneira visível, na célula hospedeira.

Muitos estudos ainda são necessários para elucidação da via metabólica de síntese de (glico)esfingolipídeos em *Leishmanias* para melhor compreender o papel dessas moléculas na sobrevivência do parasita e de suas implicações no processo infeccioso.

CONCLUSÕES

1. Formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* secretam PPGs no meio de cultura e em macrófagos infectados, respectivamente.
2. O pPPG secretado por formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* permanece no gel de empacotamento em SDS-PAGE. O perfil de reatividade dos mAbs com os pPPGs foi semelhante para os mAbs anti-GSLs ST-3, ST-5 e mAb anti-LPG VST-1, e sugerem que o essas moléculas apresentam epitopos carboidratos comuns aos GSLs e LPGs.
3. Estudos imunohistoquímicos de lesões de hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis* mostraram que os amastigotas secretam um componente localizado no vacúolo parasitóforo, visualizado mesmo após tratamento das lesões com mistura de solvente orgânico. O aPPG apresenta baixa mobilidade em SDS-PAGE sendo reconhecido pelos mAbs ST-3, ST-4 e ST-5, mas não pelo mAb VST-1.
4. O pPPG de *L. (L.) amazonensis* é constituído por manose:galactose:glucose, na proporção molar de 1:1,2:1,7. Já o aPPG é constituído por manose:galactose:glucose na proporção de 1:2:9.
5. Os LPGs e pPPGs de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* não são capazes de induzir a produção de NO em culturas de macrófagos peritoneais. As células incubadas concomitantemente com INF- γ e LPG ou pPPG foram capazes de produzir NO. O LPG e o PPG não estimularam a produção de TNF- α .

6. As culturas de macrófagos peritoneais estimuladas com GSLs não produziram NO, mesmo na presença de INF- γ . Os GSLs também não estimularam a produção de TNF- α .

7. O aPPG de *L. (L.) amazonensis* per se foi capaz de estimular a produção de NO em cultura de macrófagos peritoneais.

8. Nos estudos do efeito da estimulação concomitante dos GSLs e pPPGs/aPPGs na produção de óxido nítrico pelo macrófago foi observado que os GSLs neutros totais e GSLs neutros não reativos com mAb ST-3 (esse último em menor grau) foram capazes de inibir a produção de NO estimulado pela presença de aPPG, aPPG/INF- γ e pPPG/INF- γ .

9. Amastigotas axênicos de *L. (L.) amazonensis* apresentaram diferenças no perfil glicolipídico em relação aos amastigotas isolados de lesão. Além disso, os mAbs ST-3, ST-4 e ST-5 não apresentaram reatividade com as formas axênicas. Nenhuma das formas de amastigotas (lesão ou axênica) apresentou reatividade com mAb VST-1.

10. A fração insolúvel ao Triton X-100 a 4°C e as frações de DRMs isoladas por gradiente de sacarose de formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* são enriquecidas de glicosfingolipídeos, esteróis, esfingomiélna, e apresenta também pequenas quantidades de fosfolipídeos como a fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina.

11. Em formas promastigotas procíclicas de *L. (L.) amazonensis*, os resultados mostraram claramente que a maior parte dos glicolipídeos (GIPLs) e inositol fosforilceramida estão localizados nos DRMs, insolúveis ao detergente Triton X-100 a 4°C.

12. A AbA inibiu totalmente o crescimento das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e esse efeito foi reversível após a retirada da droga do meio de cultura. Ensaio *in vivo* mostraram que animais infectados com os parasitas tratados com AbA apresentaram um desenvolvimento tardio da infecção, em relação ao controle.

13. A AbA apresentou efeito tóxico sobre as formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Ensaio com o inibidor em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos infectados com formas amastigotas mostraram que a AbA quando adicionada 2 horas após a infecção ou 24 horas após a infecção, promove uma diminuição significativa índice fagocítico, devido a redução do número de células infectadas e do número médio de parasitas por célula.

14. Ensaio de marcação de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* com serina tritiada mostraram que a síntese de IPC é inibida pela AbA.

REFERÊNCIAS

- Aebischer T, Harbecke D, Ilg T. Proteophosphoglycan, a major secreted product of intracellular *Leishmania mexicana* amastigotes, is a poor B-cell antigen and does not elicit a specific conventional CD4+ T-cell response (1999). *Infect Immun*, 67:5379-85.
- Alexander J, Russell DG. The interaction of *Leishmania* species with macrophages (1992). *Adv Parasitol*, 31:175-254.
- Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism (1999). *J Cell Sci*, 112(Pt 18):2993-3002.
- Assreuy J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'Donnell CA, Liew FY, Moncada S. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major* (1994). *Eur J Immunol*, 24(3):672-6.
- Bahr V, Stierhof YD, Ilg T, Demar M, Quinten M, Overath P. Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana* (1993). *Mol Biochem Parasitol*, 58(1):107-21.
- Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres AP, Cabrera N, Gonzalez A, Maldonado C, Isibasi A. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2 (2003). *Mol Biochem Parasitol*, 130(2):65-74.
- Bogdan C, Gessner A, Rollinghoff M. Cytokines in leishmaniasis: a complex network of stimulatory and inhibitory interactions (1993). *Immunobiology*, 189(3-4):356-96.
- Bogdan C, Rollinghoff M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? (1999). *Parasitol Today*, 15(1):22-8.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding (1976). *Anal Biochem*, 72:248-54.
- Brandão-Filho S, Shaw J. Leishmaniasis in Brazil (1994). *Parasitol Today* 10:329-30.
- Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. Role of the *Leishmania* surface protease gp63

in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis (1995). *J Immunol*, 155(6):3102-11.

Brittingham A, Mosser DM. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes (1996). *Parasitol Today*, 12(11):444-7.

Brittingham A, Chen G, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin (1999). *Infect Immun*, 67(9):4477-84.

Brown DA, Rose JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface (1992). *Cell*, 68:533-44.

Connell ND, Medina-Acosta E, McMaster WR, Bloom BR, Russell DG. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guerin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63 (1993). *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:11473-7.

Chakraborty D, Banerjee S, Sen A, Banerjee KK, Das P, Roy S. *Leishmania donovani* affects antigen presentation of macrophage by disrupting lipid rafts (2005). *J Immunol*, 175(5):3214-24.

Chan J, Fujiwara T, Brennan P, McNeil M, Turco SJ, Sibille JC, Snapper M, Aisen P, Bloom BR. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen Radicals (1989). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(7):2453-7.

Chang KP, Fong D. Antigenic changes during intracellular differentiation of *Leishmania mexicana* in cultured macrophages (1982). *Infect Immun*, 36(1):430-1.

Chang KP. Cell biology of *Leishmania*. In: Wyler DJ. Modern parasite of biology. Cellular, immunological and molecular aspects; 1990, p.79-90.

Cysne-Finkelstein L, Temporal RM, Alves FA, Leon LL. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes (1998). *Exp Parasitol*, 89(1):58-62.

De-Majumdar T. *Leishmania donovani*: purification and partial characterization of a glycopospholipid antigen expressed on promastigote surface (1992). *Exp Parasitol*, 74(3):251-60.

Deng W, Thiel B, Tannenbaum CS, Hamilton TA, Stuehr DJ. Synergistic cooperation between T cell lymphokines for

induction of the nitric oxide synthase gene in murine peritoneal macrophages (1993). *J Immunol*, 151(1):322-9.

Denny PW, Field MC, Smith DF. GPI-anchored proteins and glycoconjugates segregate into lipid rafts in Kinetoplastida (2001). *FEBS Lett*, 491(1-2):148-53.

Denny PW, Goulding D, Ferguson MA, Smith DF. Sphingolipid-free *Leishmania* are defective in membrane trafficking, differentiation and infectivity (2004). *Mol Microbiol*, 52(2):313-27.

Denny PW, Smith DF. Rafts and sphingolipid biosynthesis in the kinetoplastid parasitic protozoa (2004). *Mol Microbiol*, 53(3):725-33.

Dermine JF, Duclos S, Garin J, St-Louis F, Rea S, Parton RG, Desjardins M. Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes (2001). *J Biol Chem*, 276(21):18507-12.

Dermine JF, Goyette G, Houde M, Turco SJ, Desjardins M. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 Macrophages (2005). *Cell Microbiol*, 7(9):1263-70.

Descoteaux A, Matlashewski G, Turco SJ. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan (1992). *J Immunol*, 149(9):3008-15.

Descoteaux A, Turco SJ. The lipophosphoglycan of *Leishmania* and macrophage protein kinase C (1993). *Parasitol Today*, 9(12):468-71.

Desjardins M, Descoteaux A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan (1997). *J Exp Méd*, 185(12):2061-8.

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 (2003). *Eur J Immunol*, 33(10):2822-31.

Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production (1988). *J Immunol*, 141(7):2407-12.

- Dittmer JC, Lester RL. A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms (1964). *J Lipid Res*, 15:126-7.
- Dubois M, Gillis KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances (1956). *Anal Chem*, 28:350-6.
- Ferguson MAJ. GPI membrane anchors: isolation and analysis. In Fukuda M. and Kobata A. *Glycobiology - A practical approach*. Oxford University Press (1993); p.349-83.
- Fewster ME, Burns BJ, Mead JF. Quantitative densitometric thin-layer chromatography of lipids using copper acetate reagent (1969). *J Chromatogr*, 43(1):120-6.
- Figueiredo JM, Dias WB, Mendonca-Previato L, Previato JO, Heise N. Characterization of the inositol phosphorylceramide synthase activity from *Trypanosoma cruzi* (2005). *Biochem J*, 387:519-29.
- Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. *De novo* formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(19):8655-9.
- Frommel TO, Button LL, Fujikura Y, McMaster WR. The major surface glycoprotein (GP63) is present in both life stages of *Leishmania* (1990). *Mol Biochem Parasitol*, 38(1):25-32.
- Funato K, Vallee B, Riezman H. Biosynthesis and trafficking of sphingolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (2002). *Biochemistry*, 41(51):15105-14.
- Georgopapadakou NH. Antifungals targeted to sphingolipid synthesis: focus on inositol phosphorylceramide synthase (2000). *Expert Opin Investig Drugs*, 9(8):1787-96.
- Giorgio S, Jasiulionis MG, Straus AH, Takahashi HK, Barbieri CL. Inhibition of mouse lymphocyte proliferative response by glycosphingolipids from *Leishmania (L.) amazonensis* (1992). *Exp Parasitol*, 75(1):119-25.
- Giorgio S, Santos MR, Straus AH, Takahashi HK, Barbieri CL. Effect of glycosphingolipids purified from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes on human peripheral lymphocytes (2003). *Clin Diagn Lab Immunol*, 10(3):469-72.
- Gri G, Molon B, Manes S, Pozzan T, Viola A. The inner side of T cell lipid rafts (2004). *Immunol Lett*, 94(3):247-52.

- Gupta N, Goyal N, Rastogi AK. *In vitro* cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania* (2001). *Trends in Parasitol*, 17(3):150-3.
- Guy RA, Belosevic M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages (1993). *Infect Immun*, 61(4):1553-8.
- Haldar K, Mohandas N, Samuel BU, Harrison T, Hiller NL, Akompong T, Cheres P. Protein and lipid trafficking induced in erythrocytes infected by malaria parasites (2002). *Cell Microbiol*, 4(7):383-95.
- Hakomori S. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis (1981). *Annu Rev Biochem*, 50:733-64.
- Hakomori S. Tumor-associated glycolipid antigens defined by monoclonal antibodies (1983). *Bull Cancer* 70(2):118-26.
- Hakomori S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism (1996). *Cancer Res*, 56(23):5309-18.
- Hakomori S, Igarashi Y. Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling (1995). *J Biochem (Tokyo)*, 118(6):1091-103.
- Hakomori S. Cell adhesion/recognition and signal transduction through glycosphingolipid Microdomain (2000). *Glycoconj J*, 17(3-4):143-51.
- Hanada K. Sphingolipids in infectious diseases (2005). *Jpn J Infect Dis*, 58(3):131-48.
- Handa K, Kojima N, Hakomori S. Analysis of glycolipid-dependent cell adhesion based on carbohydrate-carbohydrate interaction (2000). *Methods Enzymol*, 312:447-58.
- Handman E. Cell biology of *Leishmania* (1999). *Adv Parasitol*, 44:1-39.
- Hannun YA, Bell RM. Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation (1989). *Science*, 243(4890):500-7.
- Harder T, Engelhardt KR. Membrane domains in lymphocytes - from lipid rafts to protein scaffolds (2004). *Traffic*, 5(4):265-75.

Hilley JD, Zawadzki JL, McConville MJ, Coombs GH, Mottram JC. *Leishmania mexicana* mutants lacking glycosylphosphatidylinositol (GPI):protein transamidase provide insights into the biosynthesis and functions of GPI-anchored proteins (2000). *Mol Biol Cell*, 11(4):1183-95.

Hodgkinson VH, Soong L, Duboise SM, McMahon-Pratt D. *Leishmania amazonensis*: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms (1996). *Exp Parasitol*, 83(1):94-105.

Holzer TR, McMaster WR, Forney JD. Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana* (2006). *Mol Biochem Parasitol*, 146(2):198-218.

Ikai K, Takesako K, Shiomi K, Moriguchi M, Umeda Y, Yamamoto J, Kato I. Structure of aureobasidin A (1991). *J Antibiot*, 44:925-933.

Ilg T, Stierhof YD, Etges R, Adrian M, Harbecke D, Overath P. Secreted acid phosphatase of *Leishmania mexicana*: a filamentous phosphoglycoprotein polymer (1991). *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(19):8774-8.

Ilg T, Stierhof YD, McConville MJ, Overath P. Purification, partial characterization and immunolocalization of a proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes (1995). *Eur J Cell Biol*, 66(2):205-15.

Ilg T, Stierhof YD, Craik D, Simpson R, Handman E, Bacic A. Purification and structural characterization of a filamentous, mucin-like proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* parasites (1996). *J Biol Chem*, 271(35):21583-96.

Ilg T, Montgomery J, Stierhof YD, Handman E. Molecular cloning and characterization of a novel repeat-containing *Leishmania major* gene, *ppg1*, that encodes a membrane-associated form of proteophosphoglycan with a putative glycosylphosphatidylinositol anchor (1999). *J Biol Chem*, 274(44):31410-20.

Ilg T. Proteophosphoglycan of *Leishmania* (2000). *Parasitol Today*, 16:489-97.

Iwabuchi K, Yamamura S, Prinetti A, Handa K, Hakomori S. GM3-enriched microdomain involved in cell adhesion and signal transduction through carbohydrate-carbohydrate interaction in mouse melanoma B16 cells (1998). *J Biol Chem*, 273(15):9130-8.

- Joshi M, Dwyer DM, Nakhasi HL. Cloning and characterization of differentially expressed genes from in vitro-grown 'amastigotes' of *Leishmania donovani* (1993). *Mol Biochem Parasitol*, 58(2):345-54.
- Joshi PB, Sacks DL, Modi G, McMaster WR. Targeted gene deletion of *Leishmania major* genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (GP63) (1998). *Mol Microbiol*, 27(3):519-30.
- Joshi PB, Kelly BL, Kamhawi S, Sacks DL, McMaster WR. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor (2002). *Mol Biochem Parasitol*, 120(1):33-40.
- Karp CL, Turco SJ, Sacks DL. Lipophosphoglycan masks recognition of the *Leishmania donovani* promastigote surface by human kala-azar serum (1991). *J Immunol*, 147(2):680-4.
- Kaneshiro ES, Jayasimhulu K, Lester RL. Characterization of inositol lipids from *Leishmania donovani* promastigotes: identification of an inositol sphingophospholipid (1986). *J Lipid Res*, 27(12):1294-303.
- Kedzierski L, Montgomery J, Bullen D, Curtis J, Gardiner E, Jimenez-Ruiz A, Handman E. A leucine-rich repeat motif of *Leishmania* parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3 (2004). *J Immunol*, 172(8):4902-6.
- Kima PE, Constant SL, Hannum L, Colmenares M, Lee KS, Haberman AM, Shlomchik MJ, McMahon-Pratt D. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis (2000). *J Exp Med*, 191(6):1063-8.
- Klein C, Gopfert U, Goehring N, Stierhof YD, Ilg T. Proteophosphoglycans of *Leishmania mexicana*. Identification, purification, structural and ultrastructural characterization of the secreted promastigote proteophosphoglycan pPPG2, a stage-specific glycoisoform of amastigote aPPG (1999). *Biochem J*, 344 Pt 3:775-86.
- Kurzchalia TV, Parton RG. Membrane microdomains and caveolae (1999). *Curr Opin Cell Biol*, 11(4):424-31.
- Lafont F, Abrami L, van der Goot FG. Bacterial subversion of lipid rafts (2004). *Curr Opin Microbiol*, 7(1):4-10.
- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R.

The leishmaniasis in biology and medicine. London:Academic Press; 1987. p.1-120.

Lederkremer RM, Bertello LE. Glycoinositolphospholipids, free and as anchors of proteins, in *Trypanosoma cruzi* (2001). *Curr Pharm Des*, 7(12):1165-79.

Liew FY, Li Y, Millott S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide (1990). *J Immunol*, 145(12):4306-10.

Liew FY, O'Donnell CA. Immunology of leishmaniasis (1993). *Adv Parasitol*, 32:161-259.

Lincoln LM, Ozaki M, Donelson JE, Beetham JK. Genetic complementation of *Leishmania* deficient in PSA (GP46) restores their resistance to lysis by complement (2004). *Mol Biochem Parasitol*, 137(1):185-9.

Love DC, Esko JD, Mosser DM. A heparin-binding activity on *Leishmania* amastigotes which mediates adhesion to cellular proteoglycans (1993). *J Cell Biol*, 123:756-66.

Love DC, Kane MM, Mosser DM. *Leishmania amazonensis*: The phagocytosis of amastigotes by macrophages (1998). *Exp Parasitol*, 88:161-71.

Mandala SM, Thornton RA, Rosenbach M, Milligan J, Garcia-Calvo M, Bull HG, Kurtz MB. Khafrefungin, a novel inhibitor of sphingolipid synthesis (1997). *J Biol Chem*, 272(51):32709-14.

Mandala SM, Thornton RA, Milligan J, Rosenbach M, Garcia-Calvo M, Bull HG, Harris G, Abruzzo GK, Flattery AM, Gill CJ, Bartizal K, Dreikorn S, Kurtz MB. Rustmicin, a potent antifungal agent, inhibits sphingolipid synthesis at inositol phosphoceramide synthase (1998). *J Biol Chem*, 273(24):14942-9.

Martin I, Turco SJ, Epanand RM, Ruysschaert JM. Lipophosphoglycan of *Leishmania donovani* inhibits lipid vesicle fusion induced by the N-terminal extremity of viral fusogenic simian immunodeficiency virus Protein (1998). *Eur J Biochem*, 258(1):150-6.

McConville MJ, Bacic A, Mitchell GF, Handman E. Lipophosphoglycan of *Leishmania major* that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contains an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor (1987). *Proc Natl Acad Sci USA*, 84(24):8941-5.

- McConville MJ, Thomas-Oates JE, Ferguson MA, Homans SW. Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* (1990). *J Biol Chem*, 265(32):19611-23.
- McConville MJ, Blackwell JM. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids (1991). *J Biol Chem*, 266(23):15170-9.
- McConville MJ, Ferguson MA. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes (1993). *Biochem J*, 294 Pt 2):305-24.
- McConville MJ, Bacic A. A family of glycoinositol phospholipids from *Leishmania major*. Isolation, characterization, and antigenicity (1989). *J Biol Chem*, 264(2):757-66.
- McNeely TB, Rosen G, Londner MV, Turco SJ. Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania* (1989). *Biochem J*, 259(2):601-4.
- McNeely TB, Turco SJ. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes (1990). *J Immunol*, 144(7):2745-50.
- Medina-Acosta E, Karess RE, Cshwartz H, Russell DG. The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage (1989). *Mol Biochem Parasitol*, 37:263-73.
- Medina-Acosta E, Karess RE, Russell DG. Structurally distinct genes for the surface protease of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated (1993). *Mol Biochem Parasitol*, 57(1):31-45.
- Montgomery J, Ilg T, Thompson JK, Kobe B, Handman E. Identification and predicted structure of a leucine-rich repeat motif shared by *Leishmania major* proteophosphoglycan and Parasite Surface Antigen 2 (2000). *Mol Biochem Parasitol*, 107(2):289-95.
- Moody SF, Handman E, McConville MJ, Bacic A. The structure of *Leishmania major* amastigote lipophosphoglycan (1993). *J Biol Chem*, 268(25):18457-66.

Naderer T, Vince JE, McConville MJ. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host (2004). *Curr Mol Med*, 4(6):649-65.

Nagiec MM, Baltisberger JA, Wells GB, Lester RL, Dickson RC. The LCB2 gene of *Saccharomyces* and the related LCB1 gene encode subunits of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid synthesis (1994). *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(17):7899-902.

Nashleanas M, Kanaly S, Scott P. Control of *Leishmania major* infection in mice lacking TNF receptors (1998). *J Immunol*, 160(11):5506-13.

Nolan DP, Jackson DG, Biggs MJ, Brabazon ED, Pays A, Van Laethem F, Paturiaux-Hanocq F, Elliot JF, Voorheis HP, Pays E. Characterization of a novel alanine-rich protein located in surface microdomains in *Trypanosoma brucei* (2000). *J Biol Chem*, 275(6):4072-80.

Overath P, Stierhof YD, Wiese M. Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites - Tumultuous traffic in a pocket (1997). *Trends Cell Biol*, 7(1):27-33.

Overath P, Aebischer T. Antigen presentation by macrophages harboring intravesicular pathogens (1999). *Parasitol Today*, 15(8):325-32.

Pan AA, Duboise SM, Eperon S, Rivas L, Hodgkinson V, Traub-Cseko Y, McMahon-Pratt D. Developmental life cycle of *Leishmania* - cultivation and characterization of cultured extracellular amastigotes (1993). *J Eukaryot Microbiol*, 40(2):213-23

Parton RG, Simons K. Digging into caveolae (1995). *Science*, 269(5229):1398-9.

Patton JL, Srinivasan B, Dickson RC, Lester RL. Phenotypes of sphingolipid-dependent strains of *Saccharomyces cerevisiae* (1992). *J Bacteriol*, 174(22):7180-4.

Peder LD. Anticorpos monoclonais dirigidos a antígenos lipídicos estágio-específicos de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* [tese]. São Paulo:Universidade Federal de São Paulo, 2006.

Peters C, Aebischer T, Stierhof YD, Fuchs M, Overath P. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes (1995). *J Cell Sci*, 108 (Pt 12):3715-24.

Peters C, Kawakami M, Kaul M, Ilg T, Overath P, Aebischer T. Secreted proteophosphoglycan of *Leishmania mexicana* amastigotes activates complement by triggering the mannan binding lectin pathway (1997a). *Eur J Immunol*. 27(10):2666-72.

Peters C, Stierhof YD, Ilg T. Proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes causes vacuole formation in macrophages (1997b). *Infect Immun*, 65(2):783-6.

Perry DK. Serine palmitoyltransferase: role in apoptotic de novo ceramide synthesis and other stress responses (2002). *Biochim Biophys Acta*, 1585(2-3):146-52.

Piani A, Ilg T, Elefanty AG, Curtis J, Handman E. *Leishmania major* proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function (1999). *Microbes Infect*, 1(8):589-99.

Pinto WJ, Wells GW, Lester RL. Characterization of enzymatic synthesis of sphingolipid long-chain bases in *Saccharomyces cerevisiae*: mutant strains exhibiting long-chain-base auxotrophy are deficient in serine palmitoyltransferase activity (1992). *J Bacteriol*, 174(8):2575-81.

Pimenta PFP, Saraiva EMB, Sacks DL. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stage of *Leishmania major* (1991). *Exp Parasitol*, 72:191-204.

Pimenta PFP, Turco SJ, McConville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, Sacks DL. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut (1992). *Science*, 256:1812-5.

Pimenta PFP, Saraiva EMB, Rowton E, Modi GB, Garraway LA, Beverley SM, Turco SJ, Sacks DL. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sandflies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan (1994). *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:9155-9.

Pral EM, da Moitinho ML, Balanco JM, Teixeira VR, Milder RV, Alfieri SC. Growth phase and medium pH modulate the expression of proteinase activities and the development of megasomes in axenically cultivated *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* amastigote-like organisms (2003). *J Parasitol*, 89(1):35-43.

Proudfoot L, O'Donnell CA, Liew FY. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric

oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages (1995). *Eur J Immunol*, 25(3):745-50.

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 (1996). *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(20):10984-9.

Pucadyil TJ, Tewary P, Madhubala R, Chattopadhyay A. Cholesterol is required for *Leishmania donovani* infection: implications in leishmaniasis (2004). *Mol Biochem Parasitol*, 133(2):145-52.

Puentes SM, Da Silva RP, Sacks DL, Hammer CH, Joiner KA. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9 (1990). *J Immunol*, 145(12):4311-6.

Rajendran L, Simons K. Lipid rafts and membrane dynamics (2005). *J Cell Sci*, 118(Pt 6):1099-102.

Ralton JE, Mullin KA, McConville MJ. Intracellular trafficking of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins and free GPIs in *Leishmania mexicana* (2002). *Biochem J*, 363(Pt 2):365-75.

Ramamoorthy R, Donelson JE, Paetz KE, Maybodi M, Roberts SC, Wilson ME. Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of *Leishmania donovani chagasi* promastigotes to an infectious form (1992). *J Biol Chem*, 267(3):1888-95.

Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG (2004). *Nature*, 430(6998):463-7.

Saar Y, Ransford A, Waldman E, Mazareb S, Amin-Spector S, Plumblee J, Turco SJ, Zilberstein D. Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani* (1998). *Mol Biochem Parasitol*, 95(1):9-20.

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

Salto ML, Bertello LE, Vieira M, Docampo R, Moreno SN, de Lederkremer RM. Formation and remodeling of inositolphosphoceramides during differentiation of *Trypanosoma*

cruzi from trypomastigote to amastigote (2003). *Eukaryot Cell*, 2(4):756-68.

Schneider P, Rosat JP, Bouvier J, Louis J, Bordier C. *Leishmania major*: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages (1992). *Exp Parasitol*, 75(2):196-206.

Schneider P, Rosat JP, Ransijn A, Ferguson MA, McConville MJ. Characterization of glycoinositol phospholipids in the amastigote stage of the protozoan parasite *Leishmania major* (1993). *Biochem J*, 295(Pt 2):555-64.

Schneider P, Schnur LF, Jaffe CL, Ferguson MA, McConville MJ. Glycoinositol-phospholipid profiles of four serotypically distinct Old World *Leishmania* strains (1994). *Biochem J*, 304 (Pt 2):603-9.

Shapira M, Pedraza G. Sequence analysis and transcriptional activation of heat shock protein 83 of *Leishmania mexicana amazonensis* (1990). *Mol Biochem Parasitol*, 42(2):247-55.

Shaw JJ, Lainson R. Ecology and epidemiology; New World. In: Peters W, Killick-Kendrick R. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London:Academic Press; 1987. p.291-363.

Silveira TGV, Takahashi HK, Straus AH. Comparative study of promastigote glycolipid from *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (1996). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91:192.

Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes (1997). *Nature*, 387(6633):569-72.

Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction (2000). *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(1):31-9.

Simons K, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts, and disease (2002). *J Clin Invest*, 110(5):597-603.

Singh BN, Costello CE, Beach DH, Holz GG Jr. Di-O-alkylglycerol, mono-O-alkylglycerol and ceramide inositol phosphates of *Leishmania mexicana mexicana* promastigotes (1988). *Biochem Biophys Res Commun*, 157(3):1239-46.

Sonda S, Sala G, Ghidoni R, Hemphill A, Pieters J. Inhibitory effect of aureobasidin A on *Toxoplasma gondii* (2005). *Antimicrob Agents Chemother*, 49(5):1794-801.

Stierhof YD, Ilg T, Russell DG, Hohenberg H, Overath P. Characterization of polymer release from the flagellar pocket

- of *Leishmania mexicana* promastigotes (1994). J Cell Biol, 125:321-31.
- Stierhof YD, Wiese M, Ilg T, Overath P, Haner M, Aebi U. Structure of a filamentous phosphoglycoprotein polymer: the secreted acid phosphatase of *Leishmania mexicana* (1998). J Mol Biol, 282(1):137-48.
- Straus AH, Levery SB, Jasiulionis MG, Salyan ME, Steele SJ, Travassos LR, Hakomori S, Takahashi HK. Stage-specific glycosphingolipids from amastigote forms of *Leishmania (L.) amazonensis*. Immunogenicity and role in parasite binding and invasion of macrophages (1993). J Biol Chem, 268(18):13723-30.
- Straus AH, Suzuki E, Toledo MS, Takizawa CM, Takahashi HK. Immunochemical characterization of carbohydrate antigens from fungi, protozoa and mammals by monoclonal antibodies directed to glycan epitopes (1995). Braz J Med Biol Res, 28(8):919-23.
- Straus AH, Valero VB, Takizawa CM, Levery SB, Toledo MS, Suzuki E, Salyan ME, Hakomori S, Barbieri CL, Takahashi HK. Glycosphingolipid antigens from *Leishmania (L.) amazonensis* amastigotes. Binding of anti-glycosphingolipid monoclonal antibodies in vitro and in vivo (1997). Braz J Med Biol Res, 30(3):395-9.
- Suzuki E, Tanaka AK, Toledo MS, Takahashi HK, Straus AH. Role of beta-D-galactofuranose in *Leishmania major* macrophage invasion (2002). Infect Immun, 70(12):6592-6.
- Swihart K, Fruth U, Messmer N, Hug K, Behin R, Huang S, Del Giudice G, Aguet M, Louis JA. Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4+ T cell response (1995). J Exp Med, 181(3):961-71.
- Tachado SD, Gerold P, Schwarz R, Novakovic S, McConville M, Schofield L. 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 (1997). Proc Natl Acad Sci USA, 94(8):4022-7.
- Tachado SD, Mazhari-Tabrizi R, Schofield L. Specificity in signal transduction among glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp (1999). Parasite Immunol, 21(12):609-17.

- Takahashi HK, Almeida IC, Straus AH. Glycosphingolipids from *Leishmania mexicana amazonensis* (1989). Mem Inst Oswaldo Cruz, 84(Suppl II):48.
- Takesako K, Ikai K, Haruna F, Endo M, Shimanaka K, Sono E, Nakamura T, Kato I, Yamaguchi H. Aureobasidins, new antifungal antibiotics: taxonomy, fermentation, isolation, and properties (1991). J Antibiot, 44:919-924.
- Takesako K, Kuroda H, Inoue T, Haruna F, Yoshikawa Y, Kato I, Uchida K, Hiratani T, Yamaguchi H. Biological properties of aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic (1993). J. Antibiot 46: 1414-1420.
- Tanaka AK, Takahashi HK, Straus AH. Purification and characterization of secreted glycoconjugates of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (2002). Rev Ins Med Trop S Paulo, 44 (Suppl. 12):43.
- Tanaka AK, Gorin PAJ, Takahashi HK, Straus AH. Role of *Leishmania amazonensis* amastigote glycosphingolipids in macrophage infectivity (2005). Glycoconjugate J, 4/5/6. p. 223.
- Tewary P, Veena K, Pucadyil TJ, Chattopadhyay A, Madhubala R. The sterol-binding antibiotic nystatin inhibits entry of non-opsonized *Leishmania donovani* into macrophages (2006). Biochem Biophys Res Commun, 339(2):661-6.
- Titus RG, Sherry B, Cerami A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis (1989). J Exp Med, 170(6):2097-104.
- Turco SJ, Descoteaux A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites (1992). Annu Rev Microbiol, 46:65-94.
- Valero VB, Tanaka AK, Takahashi HK, Straus AH. Monoclonal antibodies against LPG of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (1998). Mem Inst Oswaldo Cruz, 93(Suppl II):179.
- Wang ZE, Zheng S, Corry DB, Dalton DK, Seder RA, Reiner SL, Locksley RM. Interferon gamma-independent effects of interleukin 12 administered during acute or established infection due to *Leishmania major* (1994). Proc Natl Acad Sci USA, 91(26):12932-6.
- Wells GB, Lester RL. The isolation and characterization of a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* that requires a long chain base for growth and for synthesis of phosphosphingolipids (1983). J Biol Chem, 258(17):10200-3.

Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase (1995). *Nature*, 375(6530):408-11.

WHO/OMS - World Health Organization/Organisation Mondiale de La Santé. - The Leishmaniasis and *Leishmania*/HIV co-infections (2000). Fact Sheet, 116.

Winter G, Fuchs M, McConville MJ, Stierhof YD, Overath P. Surface antigens of *Leishmania mexicana* amastigotes: characterization of glycoinositol phospholipids and a macrophage-derived glycosphingolipid (1994). *J Cell Sci*, 107 (Pt 9):2471-82.

Zanolari B, Friant S, Funato K, Sutterlin C, Stevenson BJ, Riezman H. Sphingoid base synthesis requirement for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae* (2000). *EMBO J*, 19(12):2824-33.

Zhang K, Showalter M, Revollo J, Hsu FF, Turk J, Beverley SM. Sphingolipids are essential for differentiation but not growth in *Leishmania* (2003). *EMBO J*, 22(22):6016-26.

Zhang K, Hsu FF, Scott DA, Docampo R, Turk J, Beverley SM. *Leishmania* salvage and remodelling of host sphingolipids in amastigote survival and acidocalcisome biogenesis (2005). *Mol Microbiol*, 55(5):1566-78.

Zufferey R, Allen S, Barron T, Sullivan DR, Denny PW, Almeida IC, Smith DF, Turco SJ, Ferguson MA, Beverley SM. Ether phospholipids and glycosylinositolphospholipids are not required for amastigote virulence or for inhibition of macrophage activation by *Leishmania major* (2003). *J Biol Chem*, 278(45):44708-18.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an important public health problem in Brazil. Since *Leishmania* is an obligatory intracellular parasite in the host, studies of parasite antigens responsible for interaction with the host cell during the infection are important to understand the mechanism of parasite invasion and survival.

Following this rationale, in this work it was purified and characterized proteophosphoglycans secreted by promastigote (pPPG) and amastigote (aPPG) forms in culture supernatant and into parasitophorous vacuole of infected macrophages, respectively. The PPGs were purified by combination of chromatography (DEAE-Sephadex, Octyl-Sepharose and Bio-Gel A-0.5) and ultracentrifugation. By Western blotting and solid phase radioimmunoassay using different monoclonal antibodies (mAbs), it was observed that pPPG presents high molecular weight, contains phosphoglycan chains and it is recognized by anti-glycosphingolipids (GSLs) mAbs ST-3, ST-5 and by anti-lipophosphoglycan (LPG) mAb VST-1. Immunohistological analysis of hamster footpad lesions infected with *L. (L.) amazonensis* using different mAbs showed a strong labeling on amastigote forms and inside/around macrophage parasitophorous vacuole. After delipidation of lesion sections with a mixture of isopropanol/hexane/water (condition in which GSLs are removed) it was observed that the mAbs reactivity localized inside the vacuole remained in infected tissue, thus indicating the possible localization of aPPGs secreted by *L. (L.) amazonensis* recognized by the mAbs. The aPPG showed similar electrophoretic migration of pPPG, and it was recognized by mAbs anti-GSLs ST-3, ST-4 and ST-5, but not by mAb VST-1. The analysis of monosaccharide composition of PPGs, determined by gas chromatography - mass spectrometry, showed that pPPG is constituted of

mannose:galactose:glucose at molar proportion of 1:1.2:1.7. On the other hand, aPPGs showed in their structure mannose:galactose:glucose at proportion of 1:2:9.

In parallel assays, nitric oxide (NO) and tumor necrose factor (TNF- α) production by BALB/c macrophages exposed to different *L. (L.) amazonensis* antigen stimuli were also analyzed. The pPPG, LPG and GSLs by themselves were not able to induce nitric oxide production by macrophages. On the hand, aPPG *per se* was able to induce nitric oxide production. The LPG and pPPGs were able to synergize with INF- γ the production of NO. Furthermore, GSLs were not able to stimulate NO production in presence of INF- γ . None of the antigens did induce the pro-inflammatory cytokines TNF- α secretion.

The glycolipid profile of axenic and lesion amastigotes of *L. (L.) amazonensis* was analyzed by HPTLC. The results showed a significative difference in glycolipid chromatographic profile among the parasites, and axenic amastigote glycolipids were not recognized by anti-GSL mAbs.

The membrane organization of glyco(sphingo)lipids and glycoinositolphospholipids (GIPLs) of *L. (L.) amazonensis* amastigote and promastigote forms were studied after Triton X-100 extraction at 4°C. In amastigote forms it was observed that GSLs, sterol and sphingomyelin are present in the Triton X-100 resistant membrane domains. In promastigote parasites it was observed that inositol phosphorylceramide, GIPLs, sterol and a small amount of phosphatidylethanolamine are localized in the low-density membranes insoluble in non-ionic detergent at 4°C.

In another set of experiments, it was analyzed the effect of Aureobasidin A (AbA) in *L. (L.) amazonensis* promastigote and amastigote forms. AbA inhibited completely promastigotes growth, however, it should be noted that this effect was reversible. Infectivity assays in BALB/c mice

using promastigote forms treated with AbA showed a delay in lesion development. On the other hand, the effect of AbA in *L. (L.) amazonensis* amastigotes showed that this drug is toxic to amastigote forms. AbA effect was also analyzed during the infection of macrophages by amastigote forms of *L. (L.) amazonensis*. After addition of AbA in the culture, it was observed a significative reduction of phagocytic index.

The present study shows that *Leishmania* glycoconjugates may be crucial in parasite-host cell interaction, playing important role in the parasite survival and in the disease progress.