



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



## **Monografia**

# **Leishmanolisina: um importante fator de virulência que pode ser explorado como eventual vacina contra Leishmaniose**

**Bruno Araújo Souza**

Salvador (Bahia)  
Fevereiro, 2014

**FICHA CATALOGRÁFICA**

(elaborada pela Bibl. **SONIA ABREU**, da Bibliotheca Gonçalo Moniz : Memória da Saúde Brasileira/SIBI-UFBA/FMB-UFBA)

S729	Souza, Bruno Araújo <b>Leishmanolisina: um importante fator de virulência que pode ser explorado como eventual vacina contra Leishmaniose/</b> Bruno Araújo Souza. Salvador: BA, BA, Souza, 2014.
	VIII; 35 fls.
Monografia, como exigência parcial e obrigatória para conclusão do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia (FMB), da Universidade Federal da Bahia (UFBA)	
Professor orientador: Nicolaus Albert Borges Schriefer	
Palavras chaves: 1. Leishmaniose. 2. Vacina. 3. Fatores de Virulência. I. Schriefer, Nicolaus Albert Borges. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia. III. Título.	
CDU: 616.993.161	



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



## **Monografia**

# **Leishmanolisina: um importante fator de virulência que pode ser explorado como eventual vacina contra Leishmaniose**

**Bruno Araújo Souza**

Professor orientador: **Albert Schriefer**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B60/2013.2, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia)  
Fevereiro, 2014

**Monografia:** *Leishmanolisina: um importante fator de virulência que pode ser explorado como eventual vacina contra Leishmaniose* de **Bruno Araújo Souza**.

Professor orientador: **Albert Schriefer**

**COMISSÃO REVISORA:**

- **Nicolaus Albert Borges Schriefer** (Presidente), Professor Adjunto do Departamento de Biointeração da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Vitória Regina Pedreira de Almeida Rêgo**, Professora Assistente do Departamento de Medicina Interna e Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Rafaela Cordeiro Freire**, Professora Adjunta do Departamento de Medicina Preventiva e Social da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia
- **Gleison Vieira Duarte**, Doutorando do Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPgCS) da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

**TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO:** Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no VI Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

*A lei da mente é implacável. O que você pensa, você cria. O que você sente, você atrai. O que você acredita, torna-se realidade.*  
**(Buda)**

*“Aos meus pais, Dilton Sérgio e Maria Noélia que proporcionaram condições para elaboração deste trabalho”.*

## **EQUIPE**

- Bruno Araújo Souza, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA. Correio-e: [baraujo.souza@gmail.com](mailto:baraujo.souza@gmail.com)
- Nicolaus Albert Borges Schriefer, Professor Adjunto do Departamento de Biointeração da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

### **UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

- Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)
- Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edga Santos (SIM - HUPES)

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

1. Recursos próprios.
-----------------------

## AGRADECIMENTOS

- ◆ Ao meu Professor orientador, Doutor Albert Schriefer, pela presença constante e substantivas orientações acadêmicas e à minha vida profissional de futuro médico.
- ◆ À Mestranda Lílian Medina, Serviço de Imunologia, pelo ensino dos primeiros e grandes passos na área Laboratorial.
- ◆ À doutoranda Juliana Almeida, Serviço de Imunologia, pelo auxílio e disponibilidade ininterruptas.
- ◆ Aos membros do Núcleo de Formação Científica da Faculdade de Medicina da Bahia, pela dedicação e esforço para que haja excelência na elaboração das monografias de conclusão de curso.
- ◆ Ao amigo Nestor Barreto e à amiga Beatriz Martinelli M. Gonçalves pela ajuda na tradução do resumo deste trabalho.
- ◆ Ao meu pai (Dilton), minha mãe (Noélia), minha irmã (Laís) pelo apoio imensurável em todos os momentos e por acreditarem em meu potencial.
- ◆ A todos os meus amigos e familiares pela contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional.

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE FLUXOGRAMAS E QUADROS</b>	<b>2</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIACÕES E SIGLAS</b>	<b>3</b>
<b>I. RESUMO</b>	<b>5</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>6</b>
<b>III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>7</b>
III.1. Epidemiologia	7
III.2. Biologia em <i>Leishmania</i> sp	7
III.3. Formas clínicas e imunologia	9
III.4. Fatores que determinam formas clínicas	10
III.5. Fatores de virulência	11
III.5.1. Fatores de virulência na família <i>Trypanosomatidae</i>	12
III.6. gp63 ou leishmanolisina ou MSP	13
III.7. Profilaxia e controle	15
III.8. Vacina	15
<b>IV. METODOLOGIA</b>	<b>18</b>
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>21</b>
V.1. Leishmanolisina como vacina	21
<b>VI. DISCUSSÃO</b>	<b>26</b>
<b>VII. CONCLUSÕES</b>	<b>30</b>
<b>VIII. SUMMARY</b>	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>32</b>

## ÍNDICE DE FLUXOGRAMAS E QUADROS

### FLUXOGRAMAS

<b>FLUXOGRAMA 1.</b> Seleção de artigos publicados no MEDLINE	22
<b>FLUXOGRAMA 2.</b> Seleção de artigos publicados no LILACS	23

### QUADROS

<b>QUADRO 1.</b> Perfis das vacinas de gp63 utilizadas e sumário dos resultados das imunizações	24
<b>QUADRO 2.</b> Artigos excluídos após sua pré-seleção	25

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

**AP-1:** Ativador de Proteína-1

**BCG:** Bacillus de Calmette-Guérin

**BVS:** Biblioteca Virtual em Saúde

**CAPES:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**cDNA:** DNA circular

**CpG-ODN:** CpG Oligodeoxynucleotides

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DSPC:** Cationic Distearoyl Phosphatidylcholine

**EF-1 $\alpha$ :** Elongation Factor 1-  $\alpha$

**gp63:** glicoproteína 63

**gp82:** glicoproteína 82

**gp85:** glicoproteína 85

**gp90:** glicoproteína 90

**GPI:** Glicosilfosfatidilinositol

**Hsp70:** Heat Shock Proteins70

**IL-4:** Interleucina-4

**IL-10:** Interleucina-10

**IL-12:** Interleucina-12

**INF- $\gamma$ :** Interferon Gamma

**IUBMB:** International Union of Biochemistry and Molecular Biology

**LC:** Leishmaniose Cutânea

**LD:** Leishmaniose Disseminada

**LILACS:** Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde

**LM:** Leishmaniose Mucosa

**LPG:** Lipofosfoglicano

**LTA:** Leishmaniose Tegumentar Americana

**LV:** Leishmaniose Visceral

**MHC-II:** Major Complex II

**MPL-TDM:** Monophosphoryl Lipid A- Trehalose Dicorynomycolate

**mRNA:** RNA mensageiro

**MSP:** Major Surface Protease

**NF- $\kappa$ b:** Nuclear Factor Kappa B

**NO:** Óxido Nítrico

**NOs:** Óxido Nítrico Sintase

**p38-MAP quinase:** p38 Mitogen- activated Protein Kinases

**PKC:** Protein Kinase C

**PSP:** Promastigote Surface Protease

**SciELO:** Scientific Electronic Library Online

**Tc85:** *Trypanosoma cruzi* 85

**TS:** Transialidase

## I. RESUMO

### LEISHMANOLISINA: UM IMPORTANTE FATOR DE VIRULÊNCIA QUE PODE SER EXPLORADO COMO EVENTUAL VACINA CONTRA LEISHMANIOSE

**Introdução.** Leishmaniose compreende um espectro de doenças extremamente comum em países tropicais e subtropicais. A leishmaniose é considerada um problema de saúde pública, estando aproximadamente 400 milhões de pessoas sob risco, sendo sua incidência anual e prevalência de 600.000 e 12 milhões de casos, respectivamente. A doença tem um leque de possibilidades de formas de acometimento, podendo ser fatal (forma visceral), desfigurante (forma mucocutânea) ou leve (forma cutânea). A gp63, uma metaloprotease de 63 kDa pertencente à classe dos metzincin, é a glicoproteína mais abundante da superfície da *Leishmania*. Além do mais, gp63 está associada na proteção à lise mediada pelo sistema complemento. Estudos prévios atestam que esta glicoproteína pode ser capaz de estimular citocinas envolvidas com a resposta Th1. À luz da imunologia, uma vacina deve estimular a resposta Th1 e diminuir um conjunto de fatores que são imunodepressores. A gp63 ou leishmanolisina configura-se como um conservado e importante fator de virulência em tripanossomatídeos e é uma boa candidata ao desenvolvimento de vacinas. **Objetivo.** Avaliar a gp63 como vacina contra leishmaniose. **Metodologia.** Foi realizada uma pesquisa bibliográfica através dos bancos de dados on-line SciELO, MEDLINE e LILACS. A estratégia de busca incluiu os termos “gp63, leishmanolysin, major surface protease, MSP, leishmaniasis, vaccine e virulence factor”. Estes termos foram utilizados juntamente com o operador “AND” e “OR” na seguinte formatação: “(gp63 OR leishmanolysin OR MSP OR major surface protease) AND leishmaniasis AND vaccine”. Os textos selecionados deveriam apresentar acessos livres através do portal de periódicos da CAPES, na forma de artigos originais. Deveriam ser escritos no idioma inglês, português ou espanhol, serem relacionados ao tema estudado e escrito entre os anos de 2004 e 2013. Foram excluídos os artigos publicados em idiomas que não fossem português, inglês ou espanhol; que fossem de metanálises; que não estavam relacionados à gp63; que abordassem apenas produção de citocinas sem nenhuma relação com vacina; e os que não estivessem entre o período de 2004 a 2013. **Resultados.** Após a pesquisa, encontrou-se 59 artigos, pelos critérios pré-estabelecidos e leitura dos títulos e resumos 11 artigos foram selecionados. Através da leitura, construiu-se um quadro com as seguintes variáveis: (1) tipo de resposta imunológica Th1/Th2; (2) tipo de vacina utilizada no estudo; (3) a espécie de *Leishmania* que foi escolhida nos trabalhos; e (4) a conclusão dos autores à respeito do uso da vacina na prevenção da leishmaniose. Observa-se que 9 artigos (81,8%) elaboraram seus imunógenos sob a forma de vacinas de DNA e 2 (18,1%) como vacinas de subunidades de gp63. Percebeu-se que 10 artigos (90,9%) concluíram em seus experimentos que seus compostos vacinais testados tiveram como principal resposta imunológica o tipo Th1, detectado através de análises diretas das sínteses de suas citocinas experimentalmente ou pela detecção de anticorpos como IgG2a contra a gp63. Dos 11 artigos, 5 (45,4%) trabalharam com espécies causadoras de Leishmaniose Tegumentar Americana e 6 (54,5%) com Leishmaniose Visceral (LV). Dos trabalhos com Leishmaniose Cutânea, 3 (27,2%) foram com *L. major* e 2 (18,1%) com *L. mexicana*. Em relação à LV, 5 (45,4%) foram com *L. donovani* e 1 (9,0%) com *L. infantum*. Dos 11 artigos, 10 sugeriram que suas formulações vacinais poderiam ser utilizadas para proteção contra leishmaniose; apenas 1 mostrou-se contrário. **Discussão.** Leishmanolisina pode ser utilizada como vacina contra a leishmaniose porque estimula a resposta Th1, principalmente sob a forma de vacina de DNA. **Conclusão.** Leishmanolisina pode ser utilizada como vacina contra a Leishmaniose

**Palavras-chave:** 1. Leishmaniose; 2. Vacina; 3. Fatores de Virulência

## II. OBJETIVOS

### PRINCIPAL:

Avaliar a gp63 como vacina contra leishmaniose.

### SECUNDÁRIO:

Consolidar o conhecimento a cerca da leishmanolisina na virulência da *Leishmania* sp.

### **III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **III. 1. EPIDEMIOLOGIA**

Antes de começar a escrever sobre leishmaniose é importante revelar a sua enorme importância no contexto mundial e local. Ela compreende um espectro de doenças extremamente comuns em países tropicais e subtropicais. A leishmaniose é considerada um problema de saúde pública, estando aproximadamente 400 milhões de pessoas sob risco, sendo sua incidência anual e prevalência de 600.000 e 12 milhões de casos, respectivamente(2). Diante desses números, vê-se a relevância do estudo, dos investimentos em saúde e políticas públicas de qualidade que atendam às populações mais afetadas e justificam o incentivo à pesquisa por órgãos financiadores.

A leishmaniose ocorre em cerca de 90 países no mundo, apenas 30 deles tornaram a sua notificação compulsória e a larga maioria dos casos registrados restringe-se a nações como: Irã, Arábia Saudita, Síria, Afeganistão, Peru e Brasil. Observando as estatísticas brasileiras, nota-se um crescente registro de novos casos nos últimos 20 anos – encontrando-se surtos nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e no estado do Amazonas. Nesta última localidade é possível perceber a associação entre a devastação predatória humana de matas nativas da Floresta Amazônica e, por conseguinte, ampliando o contato com o flebótomo transmissor e reservatórios naturais(3).

#### **III. 2. BIOLOGIA EM *Leishmania***

O gênero *Leishmania* pertencente à ordem *Kinetoplastida* e à família *Trypanosomatidae* é responsável pela leishmaniose, doença que afeta homens e outros animais(4). Analisando o seu ciclo de vida heteroxênico, percebe-se que alterna entre hospedeiros vertebrados e insetos vetores – estes responsáveis pela transmissão. No interior dos mamíferos, o protozoário comumente adquire a forma amastigota, arredondada, imóvel e sobrevivente no interior de fagolisossomos de células do sistema monocítico fagocitário. Nestes locais elas se reproduzem obrigatoriamente até romperem a membrana plasmática da célula hospedeira, serem liberadas e novamente fagocitadas por outros

macrófagos. Todas as espécies do gênero são transmitidas pelo repasto sanguíneo de fêmeas de dípteros infectadas da sub-família *Phlebotominae*, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* (no Novo Mundo) e *Phlebotomus* (no Velho Mundo)(3). Dentro do vetor, a *Leishmania* vive no interior do intestino, adquire a forma promastigota e próximo à probóscide transforma-se em promastigota metacíclica (forma infectante)(5).

Atualmente, classificam-se as espécies deste parasita em subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. O primeiro compreende espécies que se apresentam nos insetos vetores nas formas promastigotas e paramastigotas, sendo estas aderidas às paredes do intestino pelo flagelo e encontradas na América tropical e subtropical. A segunda (*Leishmania*) engloba parasitos do homem e mamíferos, desenvolvimento no inseto limitado ao intestino nas porções média e anterior e são encontrados no Velho e Novo Mundo.

Quando se refere à infecção em seres humanos é importante atentar-se a alguns detalhes. A pele humana apresenta 3 camadas: epiderme, derme e hipoderme. A primeira é predominantemente formada por queratinócitos e a derme contém fibroblastos, vasos linfáticos e vasos sanguíneos. A pele saudável contém células que são capazes de controlar infecções e inflamações sem necessitar da participação de linfonodos adjacentes. A epiderme possui células do sistema imune como células de Langerhans e células dendríticas, extremamente especializadas, apenas presente na pele e são responsáveis por manter o corpo humano longe de invasores danosos. Ao contrário do que se pensa, a derme também possui células que contribuem para a homeostase do sistema imune: mastócitos, células dendríticas, células T e monócitos. As células dendríticas da derme são capazes de reconhecer, internalizar e levar para linfonodos próximos corpos estranhos à pele e assim iniciar a resposta imune.

### III. 3. FORMAS CLÍNICAS E IMUNOLOGIA

A doença tem um leque de possibilidades de formas de acometimento, podendo ser fatal (forma visceral), desfigurante (forma mucocutânea) ou leve (forma cutânea)(6). A LTA é causada por diversas espécies do gênero *Leishmania*, sendo que as formas clínicas encontradas/observadas são: cutânea, mucosa, difusa e disseminada(5,6,7). A *Leishmania braziliensis* é capaz de causar LC que se caracteriza por uma única ou poucas úlceras na pele(9); LD que se manifesta por várias lesões ulceradas ou não encontradas por todo o corpo(10); e LM que se torna evidente devido aos sintomas crônicos que afetam a boca, nariz e mucosa da faringe(9,8). Essa variedade de desfechos clínicos pode ser simultaneamente encontrada em Corte de Pedra, uma área endêmica para LTA situada no sudeste do estado da Bahia.

LTA compreende diversas formas clínicas de apresentação que dependem da espécie de *Leishmania*, da cepa e da resposta do hospedeiro. A lesão no local de picada do flebótomo forma uma mácula e após 2 semanas a 3 meses pode exibir uma pápula pequena, pruriginosa, eritematosa e/ou nódulo podendo acometer linfonodos de drenagem. Caracteristicamente, esta lesão pode resolver-se espontaneamente ou formar uma úlcera. Na LC forma-se uma úlcera indolor, arredondada, bordas bem delimitadas e alta, base endurecida e um fundo com uma crosta central que às vezes pode sangrar. Neste espectro, formam-se de 1 a 10 lesões em áreas expostas do corpo. Na LD há a característica de múltiplas lesões (10 a 300) em 2 partes do corpo não contíguas. Importantes estudos vêm analisando a maneira de disseminação que pode ser por via hematogênica ou linfática. Quando se visualizam as lesões da LD, vê-se que são acneiformes, ulceradas e papulares. A LM pode ocorrer ao mesmo tempo que a LC, chamando-se Leishmaniose Mucocutânea, mas o mais comum é que a LM apareça meses ou anos após a LC. Aquela forma afeta mucosa nasal, oral e possui sintomatologia inicialmente pouco específica como coceira. As lesões podem se manifestar na forma de úlceras e pode existir perfuração do septo, o que acontece de maneira insidiosa(11).

Viu-se em parágrafos anteriores que a fêmea, do gênero *Lutzomyia*, ao fazer o repasto sanguíneo inocula na corrente sanguínea a forma infectante promastigota metacíclica e esta é internalizada por neutrófilos na derme, os quais são as primeiras células em contato com o parasito. A internalização por monócito/macrófago ocorre em aproximadamente 2 dias e é importante salientar que não existe nenhuma manifestação patológica nesta fase precoce da infecção. Este momento é marcado por liberação de citocinas responsáveis pela diferenciação de células T auxiliares, expressão de múltiplos receptores, aumento da quantidade de MHC-II na superfície celular e capacidade de apresentar antígenos pelos queratinócitos(12). Ao observar lesões iniciais em LC, percebe-se que pode existir uma alta carga parasitária. Em experimentos com *L. major*, notou-se antes do desenvolvimento da lesão um pico na quantidade de parasitas, o que argumenta a favor da presença de uma inflamação imunomediada pela pele levando a ulceração, ao invés de lesão tecidual causada pelo protozoário. O aparecimento de pequenas pápulas eritematosas pode preceder o desenvolvimento de uma lesão característica. Dependendo da espécie de *Leishmania*, podem-se visualizar nódulos eritematosos, placas endurecidas, placas descamativas ou úlceras e sendo mais atencioso: algumas vezes são vistas lesões satélites(13).

Já está comprovada que a resposta imunológica tem importante papel na forma de aparecimento ou não das úlceras. Para a LC há predomínio da resposta Th1 em que as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  medeiam a ativação dos macrófagos para controlar os parasitas(14). A LD apresenta níveis baixos de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , quando comparado com LC(7). Enquanto que LM apresenta uma exagerada resposta imune do tipo Th1 com alta produção de citocinas pró-inflamatória como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e em alguns casos baixa produção de IL-10(13,14).

### **III. 4. FATORES QUE DETERMINAM FORMAS CLÍNICAS**

Creditar apenas ao indivíduo, seus fatores genéticos, qual o desfecho clínico de uma infecção por *Leishmania* é não reconhecer o papel do parasita na manifestação clínica. Importantes estudos já fizeram correlação entre as características do DNA do protozoário e a apresentação da doença –

cutâneo- mucosa ou disseminada. Esta informação é essencial e tem grande valor, quando se pensa em prognóstico da doença, no sucesso do tratamento, no retorno do paciente à sua atividade laboral e na melhora da qualidade de vida do indivíduo.

Os protozoários pertencentes à família *Trypanosomatidae* possuem características entre si que são semelhantes, por conseguinte são classificados nesta ordem sistemática. Os 2 principais gêneros que representam são *Leishmaniae* e *Trypanosoma* que compartilham entre si a sobrevivência obrigatoriamente intracelular no hospedeiro definitivo, possuem ciclo de vida heteroxênico e polimorfismo durante os períodos no interior dos hospedeiros. Por terem entre si um ancestral comum, as espécies desses gêneros detêm fatores de virulência em comum, os quais são os principais responsáveis pela sobrevivência do organismo intracelularmente e prejuízo para o corpo que as abriga.

### III. 5. FATORES DE VIRULÊNCIA

Analisando um dos principais representantes do gênero *Trypanosoma* o *Trypanosoma cruzi*, nota-se que a maior parte da sua superfície é composta por glicoconjugados que são os principais membros de uma superfamília de glicoproteínas gp85/TS e mucinas – todas associadas com âncoras de GPI. TS é uma enzima e está envolvida na transferência de resíduos de salicilatos de glicoconjugados do hospedeiro para o parasita e a gp85 tem sido relacionada com a apoptose de células do sistema imune e diminuição na quantidade de plaquetas na fase aguda da Doença de Chagas – ela remove ácido siálico da superfície de plaquetas. Além da gp85 existem outros membros, como a subfamília Tc85 – que está envolvida na adesão do *T. cruzi* –, gp82 e gp90(16).

Por outro lado, tem-se que abordar o outro representante da família, a *Leishmania*. Este gênero possui a EF-1 $\alpha$  que está envolvida com a inibição da ativação de macrófagos; a gp63 que está envolvida com a inibição da p38-MAP quinase; as cisteínas peptidases que mostraram ser importantes para a sobrevivência no interior dos macrófagos; o LPG tem sido implicado em

alterações da maturação do fagossomo em *L. donovani*; e proteína A2 está envolvida na sobrevivência de amastigotas também de *L. donovani*(4,14).

### III. 5. 1. FATORES DE VIRULÊNCIA NA FAMÍLIA *Trypanosomatidae*

Para compreender sobre gp63 é preciso entender mais a fundo sobre os fatores de virulência em protozoários como *Trypanosoma cruzi* e espécies do gênero *Leishmania*. Desta forma, será possível perceber a grande importância que a metaloprotease tem nos desfechos clínicos de LTA, o seu papel na infecção dos indivíduos que desenvolvem leishmaniose, como o parasita escapa das defesas do hospedeiro e o seu papel no desenvolvimento de vacinas para seres humanos.

O *T. cruzi* tornou-se um crescente problema de saúde pública na Europa e nos Estados Unidos ao se perceber que existe uma elevada taxa de imigração de infectados de áreas endêmicas para estas localidades. À semelhança da *Leishmania*, este protozoário tem um ciclo de vida heteroxênico e possui polimorfismo no seu desenvolvimento – formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas infectantes. Na superfície do parasita são encontradas diversas moléculas de glicoconjugados, como membros da superfamília gp85/TS e mucinas. Essas estruturas presentes na membrana celular conferem ao organismo mecanismos de sobrevivência no interior do hospedeiro, modulam as respostas imunes humoral e celular e são capazes de fornecer pistas para o diagnóstico da Doença de Chagas, através da detecção de anticorpos por métodos sorológicos. Além das funções já citadas do TS e gp85, existem outros membros como a super-família Tc85, gp82 e gp90 que estão associadas à adesão do *T. cruzi* às células, reconhecimento de colágeno e fibronectina; à invasão destas estruturas; e à produção de anticorpos contra *N-acetylglucosamine O-linked  $\alpha$ -galactosyl residues* – um epítipo que sugere o diagnóstico de Chagas. Por outro lado, há as mucinas que ativam células ao estimularem o *Toll-like receptor 2*, e influenciam na sinalização celular das MAP-kinases e na translocação do NF- $\kappa$ B(16). Essas informações são tão importantes que experimentos que inibem a gp85/TS com anticorpos monoclonais impedem a invasão do *T. cruzi* às células do organismo hospedeiro, tornando este fator de virulência de grande relevância na infecção. Outros estudos

revelam que esta superfamília é responsável por aumentar a invasão de macrófagos pelo protozoário e induzir apoptose de linfócitos(17,18).

Em relação ao gênero *Leishmania*, existem também muitos fatores de virulência que têm funções bastante semelhantes aos do *T. cruzi* e são alvo de pesquisa em todo o mundo, como glicoinositolfosfolipídios, lipofosfoglicanos, proteofosfoglicano, proteinases e metaloproteinases. Analisando glicoinositolfosfolipídios percebe-se que este tem relação com a sobrevivência do protozoário no interior do macrófago ao ajudar a inibir a NOs e a PKC; LPG funciona como um ligante de macrófago, está bastante relacionado aos estágios iniciais da infecção, prejudica a translocação nuclear do NF- $\kappa$ B em monócitos e assim leva à diminuição da produção de IL-12; o proteofosfoglicano cobre toda a membrana plasmática e contribui para a manutenção do fagolisossomo macrofágico; e as proteinases estão envolvidas na invasão, migração para os tecidos, degradação de proteínas do hospedeiro e evasão do parasita do sistema imune(19). Já as metaloproteinases protegem o protozoário das enzimas do intestino do vetor e fornecem resistência à lise mediada pelo sistema complemento, diminuindo a fixação dos componentes terminais deste na superfície do parasita e aumentando a conversão de C3b para a forma inativa C3bi(19,20).

### **III. 6. gp63 ou LEISHMANOLISINA ou MSP**

A gp63, uma metaloprotease de 63 kDa pertencente à classe dos metzincin, é a glicoproteína mais abundante da superfície da *Leishmania*(4). Essa metaloprotease é a principal proteína de superfície do parasita e já foi encontrada em todas as formas evolutivas deste, portanto ela tem papel fundamental na sobrevivência do protozoário nos hospedeiros. Além do mais, gp63 está associada na proteção à lise mediada pelo sistema complemento, participa da clivagem do NF- $\kappa$ B, da tirosina fosfatase, reguladores do citoesqueleto de actina, inativa AP-1 e outros(21).

Esta molécula é uma enzima, mais especificamente endoenzima, que é capaz de degradar uma variedade grande de substratos proteicos como caseína, azocaseína, albumina, hemoglobina e

fibrinogênio. A metaloprotease apresenta funções diferentes em estágios diferentes da vida do parasita: liga-se ao componente C3 do complemento, quando o parasita é inoculado pelo flebótomo no hospedeiro e atua enzimaticamente desfazendo-o; e inativa o C3b, principalmente em promastigota. Esta habilidade em evadir do sistema complemento favorece a infecção e persistência da *Leishmania* no hospedeiro.

Devido à importância da gp63 na sobrevivência da *Leishmania* e seu possível emprego na confecção de vacinas, é preciso se dedicar à compreensão de aspectos morfo-estruturais, regulação e transcrição gênica, função de proteção do parasita dentro do hospedeiro e peculiaridades químicas e bioquímicas dessa molécula.

A gp63 possui outros nomes, como: glicoproteína de 63 kDa; PSP – em desuso porque esta proteína foi descoberta na forma amastigota; *Leishmanolysin* – nome escolhido pelo IUBMB; e MSP(5). Ao analisá-la estruturalmente, nota-se que existem 3 domínios: N-terminal (101-273 bases), Central (274-391 bases) e C-terminal (392-577). O domínio N-terminal corresponde ao módulo catalítico da classe dos metzincin zinco protease, possui atividade de protease a partir do seu átomo de zinco e uma sequência motivo bem definida na literatura HEXXHXXGXXH. Durante a síntese do MSP, é adicionado um pró-peptídeo à porção N-terminal que serve para manter a pró-enzima inativa durante a translação no interior da célula e há remoção após maturação e ativação proteica. Na porção C-terminal, nota-se que contém um sítio para âncoras de GPI (392-577 bases), que servem para fixar a molécula na superfície celular(5,21).

Analisando genicamente, percebe-se que existem predominantemente 3 tipos de genes responsáveis pela codificação da MSP: *MSPL*, *MSPS* e *MSPC*. Cada *locus* gênico tem suas características e momentos do ciclo celular em que são mais expressos. mRNAs de *MSPL* são predominantemente expressos na fase logarítmica de crescimento da promastigota, momento em que a quantidade de gp63 e a infectividade da célula são baixas. Por outro lado, mRNA de *MSPS* são exclusivos da fase estacionária, quando os níveis de gp63 e a infectividade da promastigota são altos.

O gene *MSPC* é expresso em todas as fases de crescimento, produzindo 2 diferentes tamanhos de mRNAs maduros devido à diferentes locais de poliadenilação.

### **III. 7. PROFILAXIA E CONTROLE**

Mesmo com todo o conhecimento a respeito do ciclo de vida e dos diversos investimentos em pesquisa sobre o parasita, o desenvolvimento de vacinas ainda é incipiente. O aparecimento de resistência do protozoário aos tratamentos convencionais e a falta de perspectivas de novas drogas em um futuro próximo que o combatam, impulsionam o interesse nas pesquisas que tentam desenvolver uma vacina(22). Por outro lado, existem diversas justificativas como questões sobre custos, complexidade antigênica, a variabilidade do organismo e diferentes tipos de respostas do hospedeiro que tornam os estudos mais longos e complicados(23). Ainda com esses entraves, 3 vacinas são conhecidas atualmente, 2 (duas) no Brasil e 1 (uma) na Europa, das quais 1 é eficaz no tratamento de LV e LC. Sabe-se também que a Leish-III<sub>f</sub> foi a única vacina de subunidade a alcançar ensaios clínicos com humanos e a Leishmune foi liberada apenas como vacina para cães saudáveis como forma de prevenção da doença(22,23).

Sendo a gp63 uma metaloprotease, com atividade de protease, presente em todas as espécies de *Leishmania* e também nas suas diferentes formas de vida, configura-se como uma importante alternativa para o desenvolvimento de vacinas. Estudos prévios atestam que esta glicoproteína pode ser capaz de estimular citocinas envolvidas com a resposta Th1 – a qual é indicadora de resposta protetora contra a doença. Diante do exposto, a gp63 é uma forte candidata para auxiliar os mecanismos orgânicos e evitar a leishmaniose(22).

### **III. 8. VACINA**

A possibilidade de desenvolver uma vacina contra a leishmaniose, configura-se como um dos mais largos e grandiosos passos para eliminar ou prevenir a doença em diversas regiões do planeta. Alguns autores confirmam que esta é uma boa medida que pode eliminar o patógeno. Em relação ao

Novo Mundo, desenvolver vacina contra a LTA é mais árduo porque existem diversas espécies causadoras desta patologia. Desta forma, há uma dificuldade intrínseca em encontrar um ponto em comum entre todas elas e assim elaborar uma vacina capaz de evitar o aparecimento de LTA. Há um agravante que precisa ser comentado, cada espécie possui mecanismos imunopatológicos distintos, o que é um fator complicador.

À luz da imunologia, uma vacina deve estimular a resposta Th1 e diminuir um conjunto de fatores que são imunodepressores. Desta forma, a partícula imunogênica deve estimular a produção de IL-12 por células apresentadoras de antígenos, as quais ativariam populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> efetores e de memória – produtores de INF- $\gamma$ . No momento em que existisse o encontro destas células com o antígeno ou patógeno, haveria indução de produção de INF- $\gamma$  e óxido nítrico pelas células infectadas – desta forma, há a destruição do microorganismo. Esta situação é propícia para o desenvolvimento de imunidade protetora durante uma infecção.

Nesta tentativa, fontes de antígeno diversas foram avaliadas, como: vacinas vivas (parasitos inteiros virulento), antígenos semi-purificados como membranas, extrato total de parasitos, antígenos intracelulares e liberados/secretados, proteínas recombinantes ou purificadas e material genético (DNA ou RNA).

Em alguns modelos experimentais, notou-se que vacinas monovalentes constituídas por BCG e extratos totais de *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. guyanensis* também pôde induzir uma proteção em camundongos C57BL/10, ainda que parcial, em cerca de 40 a 50% após desafio com formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os animais apresentaram resposta imune com níveis variáveis de INF- $\gamma$ , IL-4 e anticorpos bem como de taxas de linfoproliferações nos animais imunizados, sendo sempre superiores ao dos animais considerados controles(24). Com relação aos extratos totais, é interessante que se tenha bastante cuidado porque é uma mistura complexa de antígenos contendo membranas celulares, compostos solúveis intracelulares e material genético.

A gp63 ou leishmanolisina configura-se como um conservado e importante fator de virulência em tripanossomatídeos, incluindo *Leishmania*, portanto investigar a sua virulência e a resposta imunológica que o corpo dos animais monta contra a sua infecção é essencial para se compreender se ela é uma boa candidata ao desenvolvimento de vacinas e assim retirar as doenças da família *Trypanosomatidae* do *status* das doenças negligenciadas.

#### IV. METODOLOGIA

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica através dos bancos de dados on-line a seguir: Scielo em <http://www.scielo.org>; MEDLINE em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>; e LILACS em <http://lilacs.bvsalud.org/>.

A estratégia de busca incluiu os termos “gp63, leishmanolysin, major surface protease, MSP, leishmaniasis, vaccine e virulence factor”. Estes termos foram utilizados juntamente com o operador “AND” e “OR” na seguinte formatação: “(gp63 OR leishmanolysin OR MSP OR major surface protease) AND leishmaniasis AND vaccine”.

Os textos selecionados deveriam apresentar acessos livres através do portal de periódicos da CAPES, na forma de artigos originais. Deveriam ser escritos no idioma inglês, português ou espanhol, serem relacionados ao tema estudado e escrito entre os anos de 2004 e 2013.

A seleção dos estudos foi baseada na leitura do seu título e resumo e, quando necessário, o texto completo.

Foram excluídos os artigos publicados em idiomas que não fossem português, inglês ou espanhol; que fossem de metanálises; que não estavam relacionados à gp63; que abordassem apenas produção de citocinas sem nenhuma relação com vacina; e os que não estivessem entre o período de 2004 a 2013.

As referências e os dados relevantes de cada estudo foram obtidos e inseridos em uma tabela do *software Excel* (Microsoft; Redmond, WA) para serem resumidos e analisados. Foram utilizadas informações referentes aos autores/ano, tipo de resposta (Th1/Th2), tipo e composição da vacina, espécie parasitária testada e a conclusão a que os autores chegaram a respeito do possível uso da gp63 em uma vacina.

É importante ressaltar que nem todos os trabalhos analisados foram citados por não apresentar abordagem condizente com o objetivo do trabalho ou por terem sido buscados e lidos com o fim de melhor elucidar certos aspectos do tema para o autor desta monografia.

#### **IV. 1. BASES DE DADOS REFERENCIAIS**

A base de dados consiste em fonte de informação, onde são agrupados e organizados referências de documentos técnicos e científicos, selecionados por critérios muito bem definidos. O conceito de documento é amplo e inclui artigos, livros, teses, resumos de anais de congressos, publicações governamentais, entre outros. As bases de dados são: a) Referenciais ou Bibliográficas - quando fornecem a referência para se encontrar o documento; b) De Texto Completo – quando disponibilizam o documento na íntegra (BIREME, 2008; Amaral, 2009).

##### **IV. 1. 1. SciElo**

SciELO (Biblioteca Científica Eletrônica em Linha) é um modelo para a publicação eletrônica cooperativa de periódicos científicos na Internet. Especialmente desenvolvido para responder às necessidades da comunicação científica nos países em desenvolvimento e particularmente na América Latina e Caribe.

##### **IV. 1. 2. PUBMED/MEDLINE**

É base de dados da literatura internacional da área médica e biomédica, produzida *pela National Library of Medicine*. Contém referências bibliográficas e resumos de mais de 5.000 títulos de revistas publicadas nos Estados Unidos e em outros 70 países. Contém referências de artigos publicados desde 1966 até o presente, que cobrem as áreas de: Medicina, Biomedicina, Enfermagem, Odontologia, Medicina Veterinária e ciências afins. A atualização dessa base de dados é mensal.

### **IV. 1. 3. LILACS**

Corresponde ao índice bibliográfico da literatura relativa às ciências da saúde, publicada nos países da América Latina e Caribe, a partir de 1982, sendo o produto cooperativo da Rede BVS ([www.bireme.br](http://www.bireme.br)). Em 2009, o LILACS atingiu 500.000 mil registros bibliográficos de artigos publicados em cerca de 1.500 periódicos em ciências da saúde, das quais aproximadamente 800 são indexadas. O sistema LILACS também indexa outros tipos de literatura científica e técnica como teses, monografias, livros e capítulos de livros, trabalhos apresentados em congressos, relatórios e publicações governamentais, e pode ser acessada para pesquisa bibliográfica no Portal Global da BVS.

## V. RESULTADOS

### V. 1. LEISHMANOLISINA COMO VACINA

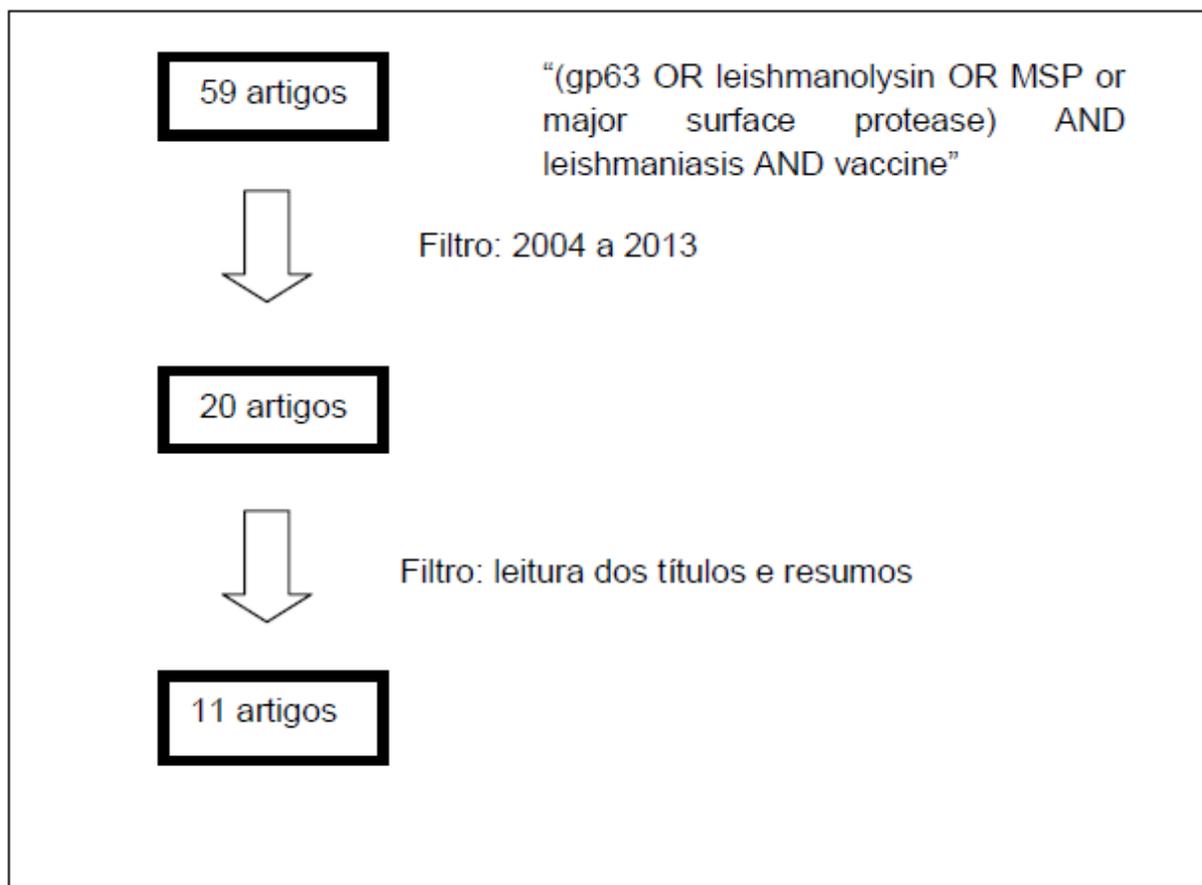
A busca através do Pubmed usando o termo “gp63 OR leishmanolysin OR MSP or major surface protease) AND leishmaniasis AND vaccine” gerou 59 artigos no idioma inglês. Aplicando o filtro temporal, resultou-se em 20 artigos. Após a leitura e devida busca em relação aos artigos encontrados na pesquisa, notou-se que 3 estavam indisponíveis para a leitura na íntegra e 6 não tinham relação com o objetivo do tema, portanto foram descartados. Desta maneira selecionou-se, pelos critérios pré-estabelecidos e leitura dos títulos e resumos, 11 artigos (**Fluxograma 1**).

O SciELO foi consultado, da mesma maneira que o MEDLINE, porém nenhum artigo foi encontrado.

A busca através da LILACS usando o termo “gp63 OR leishmanolysin OR MSP or major surface protease) AND leishmaniasis AND vaccine” gerou 5 artigos no idioma inglês. Realizando a leitura dos artigos, notou-se que 1 já havia sido indexado na base MEDLINE, 2 estavam indisponíveis para a leitura na íntegra e 2 não preenchiam os critérios (**Fluxograma 2**).

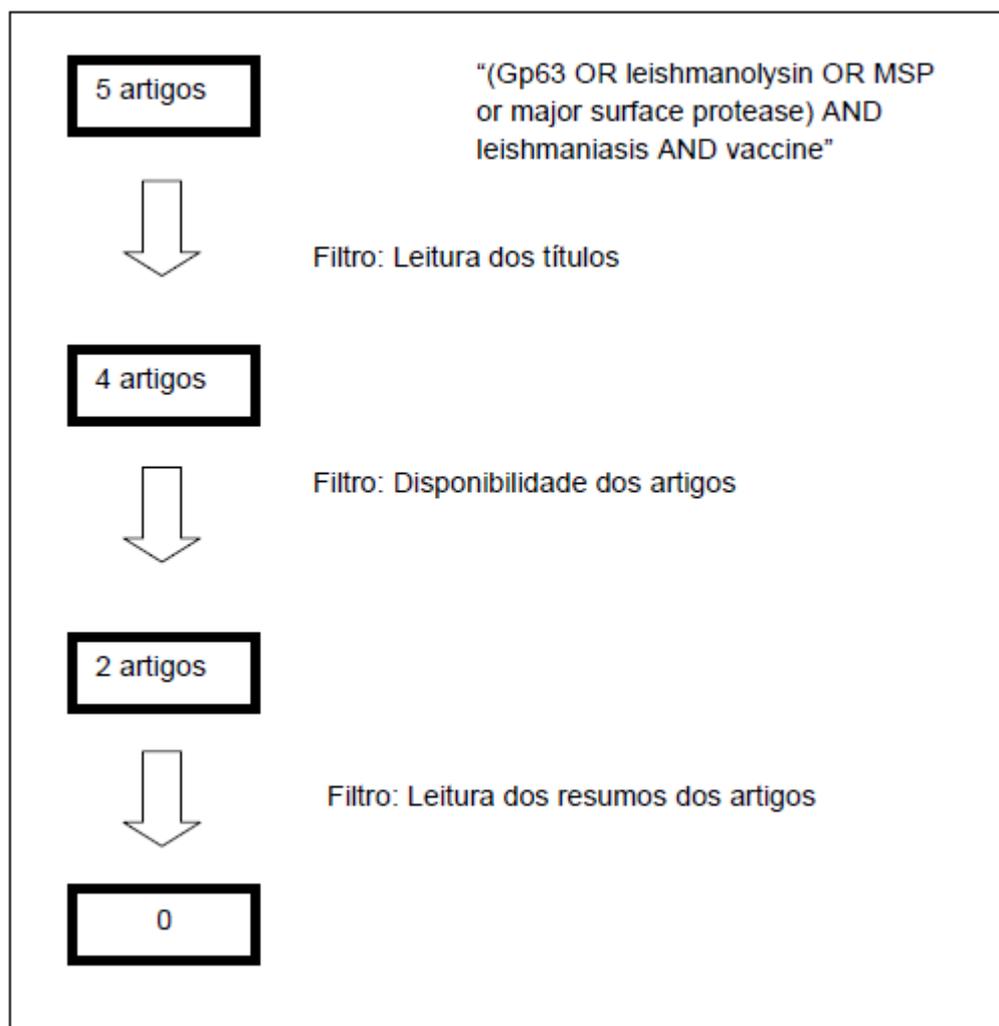
Dos artigos pesquisados foram selecionados 11 artigos, os quais abordam a relação da gp63 e suas diferentes formulações com a construção de uma vacina eficaz na prevenção da leishmaniose. Através da leitura, construiu-se um quadro com as seguintes variáveis: (1) tipo de resposta imunológica Th1/Th2; (2) tipo de vacina utilizada no estudo; (3) a espécie de *Leishmania* que foi escolhida nos trabalhos; e (4) a conclusão dos autores à respeito do uso da vacina na prevenção da leishmaniose (**Quadro 1**). Os demais 9 artigos pré-selecionados foram excluídos após suas leituras na íntegra, ora por não abordarem a gp63 como substrato para a confecção da vacina testada, ora por não terem se enquadrado nos critérios de inclusão, ora por não estarem disponíveis para a leitura através do Portal de Periódicos da CAPES. Um outro quadro foi construído contendo o autor/ano e o título dos artigos excluídos respectivamente (**Quadro 2**).

**Fluxograma 1.** Seleção de artigos publicados no MEDLINE.



Através da análise do **Quadro 1**, observa-se que 9 artigos (81,8%) elaboraram seus imunógenos sob a forma de vacinas de DNA e 2 (18,1%) como vacinas de subunidades de gp63. Quando se refere à vacina de DNA, percebe-se que as preparações realizadas por diversos autores variam em um largo espectro: uso da vacina apenas com a gp63 recombinante ou combinado a compostos adjuvantes para melhorar e aumentar a resposta imune do hospedeiro. Analisando mais criteriosamente, vê-se que adjuvantes como MPL-TDM, CpG-ODN, DSPC, lipossomos catiônicos e Hsp 70 foram usados nos experimentos. O Hsp70 já é um adjuvante bastante conhecido, comumente participa na elaboração de vacinas e nesta Revisão ele foi utilizado nas vacinas de DNA e nas de subunidade.

## Fluxograma 2. Seleção de artigos publicados no LILACS.



Para o estabelecimento de proteção e prevenção de infecção por leishmaniose, é preciso que seja produzido resposta Th1, que é composta por citocinas como INF- $\gamma$  e IL-12 e NO. Sabendo da sua importância em organismos intracelulares, percebeu-se que 10 artigos (90,9%) concluíram em seus experimentos que seus compostos vacinais testados tiveram como principal resposta imunológica o tipo Th1, detectado através de análises diretas das sínteses de suas citocinas experimentalmente ou pela detecção de anticorpos como IgG2a contra a gp63. As espécies que foram testadas são todas causadoras de LV e LTA: *L. major*, *L. mexicana*, *L. donovani* e *L. infantum*. Dos 11 artigos, 5 (45,4%) trabalharam com espécies causadoras de LTA e 6 (54,5%) com LV. Dos trabalhos com LC, 3 (27,2%) foram com *L. major* e 2 (18,1%) com *L. mexicana*. Em relação à LV, 5 (45,4%) foram com *L. donovani* e 1 (9,0%) com *L. infantum*.

**Quadro 1.** Perfis das vacinas de gp63 utilizadas e sumário dos resultados das imunizações.

Autor/Ano	Tipo de resposta imune (Th1/Th2)	Tipo de composição da vacina	Espécie parasitária em estudo	Resultado/Conclusões dos autores
<b>Rezvan, H. 2013</b>	Alto INF- $\gamma$ e nenhum nível IL-4 detectado	Subunidade	<i>L. major</i>	gp63 como vacina de subunidade
<b>Rezvan, H. 2011</b>	Elevada resposta do tipo Th1 e linfócitos T itotóxicos	gp63 cDNA	<i>L. mexicana</i>	gp63 pode ser usada como vacina
<b>Mazumder, S. 2011</b>	Elevada produção de INF- $\gamma$ , IL-12, IL-4 e IgG2a e baixo nível de IgG1 com rgp63 lipossomal misturada com MPL-TDM	rgp63 lipossomal com MPL-TDM	<i>L. donovani</i>	rgp63 lipossomal com MPL-TDM pode ser usada como vacina
<b>Mazumder, S. 2011</b>	Vacina de DNA de gp63 mais CpG-ODN foi responsável por alta produção de INF- $\gamma$	DNA de gp63 mais CpG-ODN	<i>L. donovani</i>	Deve-se usar CpG como adjuvante e gp63 em associação.
<b>Kaur, T. 2010</b>	Vacina com gp63 combinada com Hsp70 é capaz de ter alto nível de IgG2a, de INF- $\gamma$ e IL-2 e baixo de IgG1, de IL-4 e IL-10	gp63 e Hsp70	<i>L. donovani</i>	gp63 combinada com Hsp70 provaram ser mais efetiva na redução da carga parasitária
<b>Sachdeva, R. 2009</b>	Vacina de DNA <i>Polytope</i> combinada com Hsp70 estimulou resposta Th1 com elevados níveis de INF- $\gamma$ e IL-2 e baixos de IL-10	Vacina de DNA <i>Polytope</i> de gp63 com Hsp70	<i>L. donovani</i>	Vacina de DNA <i>Polytope</i> combinada com Hsp70 é a mais adequada a ser utilizada
<b>Ali, SA. 2009</b>	Vacina estimula a resposta Th1 e foi confirmado o nível elevado de IgG2a	Vacina de cDNA	<i>L. mexicana</i>	Vacina de <i>L. mexicana</i> cDNA de gp63 é adequada para o uso como vacina
<b>Bhowmick, S. 2008</b>	Vacina de gp63 em lipossomos DSPC estimula resposta Th1, altos níveis de INF- $\gamma$ , IL-12 e baixo de IL-4,	Vacina de gp63 com lipossomo DSPC	<i>L. donovani</i>	Vacina de gp63 com lipossomo DSPC pode ser usada como vacina
<b>Rodríguez-Cortés, A. 2007</b>	Vacina de DNA não suscitou resposta humoral e celular em cães	Vacina de DNA	<i>L. infantum</i>	Vacina de DNA tem que ser mais eficaz em cães
<b>Jaafari, M.R. 2007</b>	Vacina evidenciou alta relação IgG2a/IgG1, elevado nível de INF- $\gamma$ e baixo de IL-4.	Vacina de gp63 recombinante combinada com lipossomos catiônicos e CpG-ODN	<i>L. major</i>	Recomenda que a vacina seja usada com dupla encapsulação de CpG-ODN em lipossomos
<b>Jaafari, M.R. 2006</b>	Vacina apresentou alta relação IgG2a/IgG1	Vacina de gp63 recombinante aprisionado em lipossomo	<i>L. major</i>	Recomenda que a vacina seja usada com lipossomo como adjuvante

**Quadro 2.** Artigos excluídos após sua pré-seleção.

Autor/Ano	Título do Artigo
<b>Sinha S et al/2011</b>	“A gp63 based vaccine candidate against visceral leishmaniasis”
<b>Tonui WK et al/2004</b>	“Immunization with <i>Leishmania major</i> exogenous antigens protects susceptible BALB/c mice against challenge infection with <i>L. major</i> ”
<b>Nejad-Moghaddam A et al/2009</b>	“Production and characterization of monoclonal antibodies recognizing a common 57-kDa antigen of leishmania species”
<b>Tsagozis P et al/2004</b>	“Dendritic cells pulsed with peptides of gp63 induce differential protection against experimental cutaneous leishmaniasis”
<b>Gomez MA et al/2009</b>	“Leishmania gp63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases”
<b>Mayrink et al/2006</b>	“Immuno-biochemical evaluations of phenol and thimerosal as antigen preservatives in montenegro skin test”
<b>Ahmed SB et al/2004</b>	“A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to <i>L. major</i> ”
<b>Rosado-Vallado M et al/ 2005</b>	“Aluminium phosphate potentiates the efficacy of DNA vaccines against <i>Leishmania mexicana</i> ”
<b>Elfaki MEE et al/ 2011</b>	“Immunogenicity and immune modulatory effects of in silic predicted <i>L. donovani</i> candidate peptide vaccines”

Com o intuito de consolidar as impressões dos autores acerca dos seus achados e da aplicabilidade dos reagentes e esquemas de imunização por eles testados, na última coluna da Tabela 1 foram registradas as suas conclusões sobre os estudos por eles reportados. Dos 11 artigos, 10 sugeriram que suas formulações vacinais poderiam ser utilizadas para proteção contra leishmaniose; apenas 1 mostrou-se contrário.

## VI. DISCUSSÃO

Como comentado em parágrafos anteriores, a leishmaniose constitui uma das doenças do largo espectro das Doenças Negligenciadas, as quais têm como características possuírem alto grau de morbidade e baixo grau de mortalidade(25,26). A leishmaniose acomete comumente populações de baixa renda, afeta a qualidade de vida dos doentes e gera impacto sócio-econômico negativo. Associado a estas descrições, há baixo investimento das indústrias farmacêuticas na elaboração de medicamentos para o combate à doença, poucos investimentos em pesquisa de tratamentos alternativos e, como destacado por Mazumder et al. (2011) e Ali et al. (2009) crescentes taxas de resistência aos antimoniais têm sido observadas. Diante do exposto, o uso de vacinas configura-se como um dos melhores caminhos a serem trilhados para a prevenção da doença em locais endêmicos e diminuição da taxa de transmissão através dos insetos da sub-família *Phlebotominae*.

Atualmente existem diversas modalidades e diferentes tipos de vacinas, como as atenuadas, as inativadas, subunidades, polissacarídicas, conjugadas, as de DNA e outras. Muitos dos tipos já se estabeleceram a partir do seu uso rotineiro na prevenção das formas graves de tuberculose, contra a varicela, contra a febre amarela, vírus da hepatite B, difteria etc. É inegável que todas elas passam por melhorias e que há um desejo incansável no desenvolvimento de novas vacinas para tumores e doenças sem cura. Neste contexto, surgem as vacinas de DNA, as quais estão paulatinamente fazendo mais parte de novas pesquisas, em novos experimentos e configurando-se como uma boa rota a ser pesquisada, melhor elaborada e esclarecida. Moreno & Timón (2004) resumiram a importância da utilização desta nova perspectiva vacinal e corroboram com o resultado deste estudo de que 81,8% dos artigos fizeram uso da vacina de DNA em seus experimentos. Aqueles autores também fazem uma análise à respeito das características positivas relacionadas à persistência de suas propriedades imunogênicas em temperaturas não frias e ser estável e capaz de continuamente estimular a resposta imune.

É sabido que organismo causadores da Tuberculose, Doença de Chagas e Hanseníase são intracelulares e, por isto, são de difícil combate. Com a *Leishmania* não é diferente, portanto para eliminá-la o hospedeiro utiliza resposta Th1 predominantemente a fim de criar mecanismos, recrutar células capazes de atacar as células infectadas e por fim à infecção. Segundo Mazumder et al. (2011), a resistência contra a Leishmaniose é associada com uma predominante produção de INF- $\gamma$  e IL-12 e os 90,9% dos artigos que encontraram o tipo Th1 em seus experimentos estão de acordo com esta afirmação. Configura-se assim mais um indício de que as vacinas de gp63 podem ser capazes de proteger o indivíduo de infecção por *Leishmania*.

Importantes autores como Kaur et al. (2011) comentam a respeito da utilização de adjuvantes no desenvolvimento de uma vacina eficaz. Sendo assim, não é possível negar a presença delas a fim de melhorar a resposta imune, estimular as células CD4<sup>+</sup> e a resposta Th1. Os artigos do presente estudo trazem resultados de experimentos onde utilizaram gp63 e adjuvantes, a citar: CpG-ODN, MPL-TDM, lipossomos, Hsp70, lipossomos catiônicos, DSPC etc. Este é um caráter essencial porque para a confecção de um agente profilático que seja capaz de evitar a leishmaniose, é preciso que na composição se tenham substâncias que possam aumentar o estímulo às células de defesa, possibilitem a manutenção da imunogenicidade e persistência do desenvolvimento de uma resposta imunogênica.

Atualmente são usados diferentes tipos de vacina e com meios de administração também diferentes. Tem-se vacinas que utilizam microorganismos inteiros inativados, toxinas inativadas, fragmentos ou subunidade do agente e aquelas que são obtidas a partir de polissacarídeos; por outro lado a via de administração e os meios de administração são muito importantes. Moreno & Timón (2004) elucidam bastante do ponto de vista imunológico os aspectos mais relevantes das vacinas de DNA. Este tipo de vacina possibilita a modificação de sequências e a adição de epítomos heterólogos a uma proteína antigênica, induz resposta humoral e celular, é de fácil manipulação, pode ser armazenada sem necessitar de ambiente refrigerado e induzem a expressão de outras proteínas como

citocinas e co-estimuladores que facilitam a indução e manutenção da resposta imunológica. Para uma melhor resposta em relação à administração deste tipo de vacina, usa-se o “gene gun” que através do processo de biobalística promove a aceleração e introdução de micropartículas de ouro encobertas com o DNA de interesse na derme.

É sabido que a gp63 possui uma grande variabilidade genética. Segundo Tibayrenc & Ayala (1999) e Bañuls et al (1999), sabe-se pouco sobre a forma de reprodução, evolução e polimorfismo de parasitas em áreas endêmicas. Aprofundando este tema, consegue-se intervir terapêuticamente e preventivamente de maneira eficiente. Ainda de acordo com aqueles autores e Saravia et al (1998), o polimorfismo pode estar associado aos desfechos clínicos – LC, LM e LD – e a evolução do quadro clínico de acordo com intervenções medicamentosas. Esta análise genética é de extrema importância porque se pode confeccionar vacinas específicas que sejam eficientes e eficazes em uma dada região endêmica e evita-se falha na prevenção da doença. Com isto, é de grande relevância investigar sorotipos nas áreas endêmicas para se estabelecer quais são os alelos de gp63 mais frequentes nas cepas de *Leishmania* associadas a infecções em seres humanos.

Sempre quando se refere a vacinação é de extrema relevância o desenvolvimento de vacinas que possam ser facilmente administradas, a exemplo da vacina contra a poliomielite que é administrada oralmente, e que possam ser utilizadas em larga escala com segurança. A modalidade de administração tem que ser bem pontuada porque muitas vezes requer profissional treinado e ambiente com recursos para uma melhor aplicação. O uso de técnicas de aplicação mais refinadas impescinde de profissional mais qualificado para poder fazer o uso correto e manipular de maneira adequada todo o material, portanto o uso do “gene gun” pode ser um fator de desvantagem na aplicação de vacinas de DNA.

Muitos métodos são válidos no combate à leishmaniose, como a Vigilância Epidemiológica que abrange a detecção do caso, confirmação, registro de sua terapêutica, fluxo de atendimento e informação, até finalizar com as análises de dados distribuídos em indicadores epidemiológicos e

indicadores operacionais, visualizando e caracterizando a distribuição da doença e de seu perfil clínico e epidemiológico. Nas áreas de maior incidência, as equipes de saúde têm importante papel na busca ativa de casos e na utilização de atividades educacionais junto à comunidade. Outros métodos eficazes são redução do contato vetorial através de inseticidas de uso residual, do uso de medidas de proteção individual como mosquiteiros, telas finas nas janelas e portas, repelentes e roupas que protejam as áreas expostas. Outra estratégia de controle são os cuidados com os animais peridomésticos como galinhas, as condições de saneamento para evitar o acúmulo de lixo e de detritos que possam atrair roedores e pequenos mamíferos, somadas as melhorias das condições habitacionais. Por fim aliadas a estas medidas deveriam ser valorizadas as atividades de capacitação continuada dos profissionais de saúde em todos os seus níveis.

## VII. CONCLUSÃO

1. A leishmanolisina apresenta funções diferentes em estágios diferentes da vida do parasita: liga-se ao componente C3 do complemento desfazendo-o; e inativa o C3b, principalmente em promastigota.
2. A vacina de DNA é uma boa alternativa contra a leishmaniose e observou-se que 9 artigos (81,8%) elaboraram seus imunógenos sob a forma de vacinas de DNA.
3. Para o combate à leishmaniose, sabe-se que a melhor resposta é a Th1 e esta informação foi vista em 10 artigos (90,9%).
4. Dos 11 artigos, 10 sugeriram que suas formulações vacinais poderiam ser utilizadas para proteção contra leishmaniose e apenas 1 mostrou-se contrário.
5. Leishmanolisina pode ser utilizada como vacina na prevenção de leishmaniose, principalmente se for utilizada como vacina de DNA.

## VIII. SUMMARY

### LEISHMANIOLYSIN: AN IMPORTANT VIRULENCE FACTOR THAT CAN BE EXPLORED AS A POSSIBLE VACCINE FOR LEISHMANIASIS

**Introduction.** Leishmaniasis comprises an extremely common spectrum of diseases in tropical and subtropical countries. It is considered a public health problem, with approximately 400 million people at risk, reaching an annual incidence and prevalence of 600,000 and 12 million, respectively. The disease has a range of possible forms of involvement, which can be fatal (visceral form), disfiguring (mucocutaneous form) or mild (cutaneous). gp63, a metalloprotease of 63 kDa belonging to the class of metzincin, is the most abundant surface glycoprotein of *Leishmania*. Moreover, gp63 is associated with protection against complement-mediated lysis. Previous studies show that this glycoprotein may be able to stimulate cytokine involved in Th1 response. In light of Immunology, a vaccine must stimulate Th1 and decrease a set of factors that are immunosuppressive. gp63 or leishmanolysin appears as a conserved and important virulence factor in trypanosomes and is a good candidate for vaccine development. **Objective.** Evaluate gp63 as a vaccine against leishmaniasis. **Methodology.** Literature search was conducted through online databases SciELO, MEDLINE and LILACS. Search strategy included the terms "gp63, leishmanolysin, major surface protease, MSP, leishmaniasis, and vaccine virulence factor" These words were used together with the operator "AND" and " OR " in the following format: " (gp63 OR leishmanolysin OR MSP OR major surface protease) AND leishmaniasis AND vaccine". Selected texts should provide free access through CAPES portal serial, in the form of original articles. These articles should be written in English, Portuguese or Spanish, related to the topic being studied, and published between 2004 and 2013. Articles would be excluded if: written in languages other than Portuguese, English or Spanish; metanalyses; not related to gp63; if addressed cytokine production only, with no relation to the vaccine; not published between 2004 and 2013. **Results.** Upon research, we found 59 articles according to pre-established criteria and by reading their titles and abstracts 11 articles were selected. Through reading, a table was built considering the following variables: (1). type of Th1/Th2 immune response, (2) type of vaccine used in the study, (3) the species of *Leishmania* that was chosen in the work, and (4) the conclusion of the authors regarding the use of the vaccine in the prevention of leishmaniasis. It was observed that 9 articles (81.8%) made their immunogens in the form of DNA vaccines and 2 (18.1%) as gp63 subunit vaccines. Ten articles (90.9%) found in their experiments that the tested vaccine compounds had mainly a Th1 immune response, detected by direct analysis of the synthesis of cytokines or their experimentally by detecting antibodies against gp63 as IgG2a. Of the 11 articles, 5 (45.4%) worked with species causing leishmaniasis and 6 (54.5%) with visceral leishmaniasis (VL). Of the works with cutaneous leishmaniasis, 3 (27.2 %) were with *L. major* and 2 (18.1 %) with *L. mexicana*. Regarding VL, 5 (45.4 %) were with *L. donovani* and 1 (9.0 %) with *L. infantum*. Among the 11 articles, 10 have suggested that their vaccine formulations could be used for protection against leishmaniasis, while only one stated the contrary. **Discussion.** Leishmanolysin can be used as a vaccine against leishmaniasis because it stimulates Th1 response, especially in the form of DNA vaccines.. **Conclusions.** Leishmanolysin can be used as a vaccine.

**Palavras-chave: 1. Leishmaniasis; 2. Vaccine; 3. Virulence Factors**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Jaafari MR, Ghafarian A, Farrokh-Gisour A, Samiei A, Kheiri MT, Mahboudi F, et al. Immune response and protection assay of recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) reconstituted with liposomes in BALB/c mice. *Vaccine* [Internet]. 2006 Jul 17 [cited 2013 Dec 20];24(29-30):5708–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16740346>
2. Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HA, Jesus AR De, et al. Multiclonal *Leishmania braziliensis* Population Structure and Its Clinical Implication in a Region of Endemicity for American Tegumentary Leishmaniasis. *Infect. Immun.* 2004;72(1):508–14.
3. Gontijo B, Carvalho M de LR. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2003 [cited 2012 Dec 13];36(1):71–80. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v36n1/15310.pdf>
4. Neves DP, Wagner R, Vitor DA, Mastigophora S, Siqueira AM, Suzan M, et al. *Parasitologia Humana*. 2004.
5. Yao C, Donelson JE, Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol. Biochem. Parasitol.* [Internet]. 2003 Nov [cited 2012 Oct 14];132(1):1–16. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166685103002111>
6. Bianchini G, Bocedi A, Ascenzi P, Gavuzzo E, Mazza F, Aschi M. Molecular Dynamics Simulation of *Leishmania* major Surface Metalloprotease GP63 ( Leishmanolysin ). 2006;390(May):385–90.
7. Gomez MA, Contreras I, Hallé M, Tremblay ML, McMaster RW, Olivier M. *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Sci. Signal.* [Internet]. 2009 Jan [cited 2012 Oct 21];2(90):ra58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19797268>
8. McConville MJ, Naderer T. Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. *Annu. Rev. Microbiol.* [Internet]. 2011 Jan [cited 2013 Oct 31];65:543–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21721937>
9. Cuervo P, Santos ALS, Alves CR, Menezes GC, Silva B a, Britto C, et al. Cellular localization and expression of gp63 homologous metalloproteases in *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* strains. *Acta Trop.* [Internet]. 2008 Jun [cited 2012 Oct 21];106(3):143–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18423419>
10. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J. Infect. Dis.* [Internet]. 2002 Dec 15;186(12):1829–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12447770>
11. Goto H, Lauletta Lindoso JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* [Internet]. 2012 Jun [cited 2012 Nov 9];26(2):293–307. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632640>

12. Ehrchen JM, Roebrock K, Foell D, Nippe N, von Stebut E, Weiss JM, et al. Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis. *PLoS Pathog.* [Internet]. 2010 May [cited 2012 Oct 31];6(4):e1000871. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2861693&tool=pmcentrez&render type=abstract>
13. Nylén S, Eidsmo L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* [Internet]. 2012 Dec [cited 2012 Nov 28];34(12):551–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23009296>
14. Purdy JE, Donelson JE, Wilson ME. Regulation of genes encoding the major surface protease of *Leishmania chagasi* via mRNA stability. *Mol. Biochem. Parasitol.* [Internet]. 2005 Jul [cited 2012 Oct 21];142(1):88–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15876463>
15. Thiakaki M, Kolli B, Chang K-P, Soteriadou K. Down-regulation of gp63 level in *Leishmania amazonensis* promastigotes reduces their infectivity in BALB/c mice. *Microbes Infect.* [Internet]. 2006 May [cited 2012 Oct 21];8(6):1455–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16698300>
16. Torrecilhas AC, Schumacher RI, Alves MJM, Colli W. Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. *Microbes Infect.* [Internet]. 2012 Aug 2 [cited 2012 Nov 5]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22892602>
17. Tonelli RR, Giordano RJ, Barbu EM, Torrecilhas AC, Kobayashi GS, Langley RR, et al. Role of the gp85/trans-sialidases in *Trypanosoma cruzi* tissue tropism: preferential binding of a conserved peptide motif to the vasculature in vivo. *PLoS Negl. Trop. Dis.* [Internet]. 2010 Jan [cited 2013 Mar 6];4(11):e864. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2970537&tool=pmcentrez&render type=abstract>
18. Tonelli RR, Torrecilhas a C, Jacysyn JF, Juliano M a, Colli W, Alves MJM. In vivo infection by *Trypanosoma cruzi*: the conserved FLY domain of the gp85/trans-sialidase family potentiates host infection. *Parasitology* [Internet]. 2011 Apr [cited 2013 Mar 18];138(4):481–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21040619>
19. Silva-Almeida M, Pereira BAS, Ribeiro-Guimarães ML, Alves CR. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasit. Vectors* [Internet]. 2012 Jan [cited 2013 Mar 6];5:160. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3436776&tool=pmcentrez&render type=abstract>
20. Pandey S, Chakraborti P, Sharma R, Bandyopadhyay S, Sarkar D, Adhya S. Involvement of *Leishmania donovani* major surface glycoprotein gp63 in promastigote multiplication. *J. Biosci.* [Internet]. 2004 Mar;29(1):15–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286399>
21. Contreras I, Gómez MA, Nguyen O, Shio MT, McMaster RW, Olivier M. *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. *PLoS Pathog.* [Internet]. 2010 Jan [cited 2012 Oct 21];6(10):e1001148. Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2954837&tool=pmcentrez&render type=abstract>
22. Kaur T, Sobti RC, Kaur S. Cocktail of gp63 and Hsp70 induces protection against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. [Internet]. *Parasite Immunol.* 2011. p. 95–103. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21226722>
  23. Singh B, Sundar S. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Jun 6 [cited 2012 Oct 11];30(26):3834–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22475861>
  24. Mayrink W, Santos GC Dos, Toledo VDPCP De, Guimaraes TMPD, Machado-Coelho GLL, Genaro O, et al. Vaccination of C57BL/10 mice against cutaneous Leishmaniasis using killed promastigotes of different strains and species of *Leishmania*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [Internet]. 2002;35(2):125–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12011920>
  25. Moran M. A breakthrough in R&D for neglected diseases: new ways to get the drugs we need. *PLoS Med.* [Internet]. 2005 Sep [cited 2013 Nov 6];2(9):e302. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1198042&tool=pmcentrez&render type=abstract>
  26. Kealey A, Smith R. Neglected tropical diseases: infection, modeling, and control. *J. Health Care Poor Underserved* [Internet]. 2010 Feb;21(1):53–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20173255>
  27. Ban AL, Hide M, Tibayrenc M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. 1999;29:1137–47.
  28. Saravia NG, Segura I, Holguin a F, Santrich C, Valderrama L, Ocampo C. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania* (*Viannia*) in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* [Internet]. 1998 Jul;59(1):86–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9684634>
  29. Moreno S, Tim M. Revisi ó n DNA vaccination : an immunological perspective. 2004;23(1):41–55.
  30. Rezvan H. Immunogenicity of HLA-DR1 Restricted Peptides Derived from *Leishmania major* gp63 Using FVB/N-DR1 Transgenic Mouse Model. *Iran. J. Parasitol.* [Internet]. 2013 Apr;8(2):273–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3724153&tool=pmcentrez&render type=abstract>
  31. Mazumder S, Maji M, Ali N. Potentiating effects of MPL on DSPC bearing cationic liposomes promote recombinant GP63 vaccine efficacy: high immunogenicity and protection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* [Internet]. 2011 Dec [cited 2013 Dec 13];5(12):e1429. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3243702&tool=pmcentrez&render type=abstract>
  32. Rezvan H, Rees R, Ali SA. *Iranian J Parasitol.* 2011;6(4):60–75.

33. Mazumder S, Maji M, Das A, Ali N. Potency, efficacy and durability of DNA/DNA, DNA/protein and protein/protein based vaccination using gp63 against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. *PLoS One* [Internet]. 2011 Jan [cited 2013 Dec 20];6(2):e14644. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3032732&tool=pmcentrez&render type=abstract>
34. Sachdeva R, Banerjea AC, Malla N, Dubey ML. Immunogenicity and efficacy of single antigen Gp63, polytope and polytopeHSP70 DNA vaccines against visceral Leishmaniasis in experimental mouse model. *PLoS One* [Internet]. 2009 Jan [cited 2013 Dec 19];4(12):e7880. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2780826&tool=pmcentrez&render type=abstract>
35. Ali S a, Rezvan H, McArdle SE, Khodadadi a, Asteal F a, Rees RC. CTL responses to *Leishmania mexicana* gp63-cDNA vaccine in a murine model. *Parasite Immunol.* [Internet]. 2009 Jul [cited 2013 Dec 20];31(7):373–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19527453>
36. Bhowmick S, Ravindran R, Ali N. gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.* [Internet]. 2008 Mar [cited 2012 Oct 21];76(3):1003–15. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2258822&tool=pmcentrez&render type=abstract>
37. Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, López-Fuertes L, Timón M, Altet L, Solano-Gallego L, et al. Vaccination with plasmid DNA encoding KMPII, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine* [Internet]. 2007 Nov 14 [cited 2013 Dec 20];25(46):7962–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17942199>
38. Jaafari MR, Badiie A, Khamesipour A, Samiei A, Soroush D, Kheiri MT, et al. The role of CpG ODN in enhancement of immune response and protection in BALB/c mice immunized with recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) encapsulated in cationic liposome. *Vaccine* [Internet]. 2007 Aug 10 [cited 2013 Dec 20];25(32):6107–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17629372>
39. Tibayrenc M, Ayala FJ. Evolutionary genetics of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Microbes Infect.* [Internet]. 1999 May;1(6):465–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10602679>