



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA**

ELIANE LEITE DA TRINDADE

**ANÁLISE COMPARATIVA DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE
CONSTITUTIVA (CNOS) EM DIFERENTES ESPÉCIES DE
LEISHMANIA CAUSADORAS DE LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR**

BELÉM - PA

2009

ELIANE LEITE DA TRINDADE

**ANÁLISE COMPARATIVA DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE
CONSTITUTIVA (CNOS) EM DIFERENTES ESPÉCIES DE
LEISHMANIA CAUSADORAS DE LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Biomedicina da Universidade Federal
do Pará, como requisito parcial para a obtenção do
grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a Dr^a Edilene Oliveira da Silva

BELÉM - PA

2009

ELIANE LEITE DA TRINDADE

**ANÁLISE COMPARATIVA DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE
CONSTITUTIVA (CNOS) EM DIFERENTES ESPÉCIES DE
LEISHMANIA CAUSADORAS DE LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Biomedicina da Universidade Federal
do Pará, como requisito parcial para a obtenção do
grau de Bacharel em Biomedicina.

Prof^a Dr^a Edilene Oliveira da Silva
Orientadora
(ICB – UFPA)

Prof^a Dr^a. Edna Aoba Yassui Ishikawa
(NMT – UFPA)

Prof^a Dr^a. Sanny Helena Valente de Oliveira Albério
(CCBS – UEPA)

BELÉM (PA), 16 de Dezembro de 2009.

"As pessoas realmente se tornam completamente extraordinárias quando elas começam a pensar que elas conseguem fazer as coisas. Quando elas acreditam em si mesmas, elas adquirem o primeiro segredo do sucesso."

(Dr. Norman Vincent Peale)

Aos meus pais por todo apoio e compreensão...

As minhas irmãs pelo carinho e incentivo...

Ao meu namorado Jordan, amigo e companheiro de todos os momentos por acreditar nos meus ideais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

A minha família que sempre me apoiou em todas as decisões da minha vida. Durante o curso, pude sempre contar com elogios e críticas construtivas, fazendo com que, hoje, eu possa me tornar uma profissional melhor.

De forma especial agradeço ao meu namorado Jordan, amigo, companheiro de todos os momentos, que com todo carinho, sempre me incentivou e me ajudou quando eu mais precisei de ajuda.

À Amanda Hage, amiga, parceira de curso, laboratório e dos estágios supervisionados, que sempre me ajudou e participou de forma decisiva para a realização desse sonho.

Um agradecimento especial a Dona Nely, mãe da Amanda Hage que sempre me deu força nos estudos, além das caronas quando saía tarde da Universidade.

Aos amigos de curso, que encerram comigo mais esta jornada, obrigada pela amizade, companheirismo que sempre me deram palavras de ânimo e torceram por mim.

Aos amigos Diogo Brenner e Paulo Alexandre que me ajudaram de forma decisiva nesse trabalho.

Às amigas de curso Sara lobato e Fernanda loureiro, que fizeram esta jornada mais gostosa e agradável vou sentir imensas saudades de todos os momentos que passamos juntos, nas reuniões dos trabalhos, em meio a risadas, dores de cabeça que, no fim, provaram que "a união faz força".

À Prof^a. Dr^a. Edilene Oliveira da Silva, pela paciência, pelos ensinamentos e pelo incentivo à pesquisa e ao aprendizado.

A todos do Laboratório de Parasitologia, pelo companheirismo, apoio, ensinamentos e pelos momentos de descontração.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS e TABELAS	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 AS LEISHMANIOSES	2
1.1.1 LEISHMANIOSES CAUSADAS POR L. (L.) <i>amazonensis</i> , L. (V.) <i>shawi</i> e L. (V.) <i>braziliensis</i>	2
1.1.2 Agente Etiológico – Morfologia.....	3
1.1.3 Ciclo	5
1.2 A CÉLULA HOSPEDEIRA.....	6
1.3 A INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO	8
1.4 JUSTIFICATIVA	10
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DO PARASITO	12
3.2 OBTENÇÃO E CULTIVO DA CÉLULA HOSPEDEIRA.....	12
3.3 MEDIDA DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM SOBRENADANTE DE CULTURA DAS DIFERENTES ESPÉCIES	13
3.4 DETECÇÃO DA ATIVIDADE DIAFORÁSICA DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE CONSTITUTIVA (CNOS) ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CITOQUÍMICA NAS DIFERENTES ESPÉCIES	13
3.5 DETECÇÃO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE CONSTITUTIVA (CNOS) POR IMUNOFLUORESCÊNCIA	13

3.6 MEDIDA DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM <i>L. (V.) shawi</i> E <i>L. (L.) amazonensis</i>	14
3.7 DETECÇÃO DA ATIVIDADE DIAFORÁSICA DA ENZIMA (INOS) EM MACRÓFAGOS INFECTADOS COM <i>L. (V.) shawi</i> E <i>L. (L.) amazonensis</i>	14
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	15
4 RESULTADOS	16
4.1 MEDIDA DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM SOBRENADANTE DE CULTURA DAS DIFERENTES ESPÉCIES DE LEISHMANIA	16
4.2 DETECÇÃO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE CONSTITUTIVA (CNOS) ATRAVÉS DA TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	17
4.3 DETECÇÃO DA ATIVIDADE DIAFORÁSICA DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE CONSTITUTIVA (CNOS) ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CITOQUÍMICA	19
4.4 DETECÇÃO DA ATIVIDADE DIAFORÁSICA DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA (INOS) DURANTE INTERAÇÃO COM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS	21
4.5 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS INFECTADOS POR <i>L. (V.) shawi</i> E <i>L. (L.) amazonensis</i>	22
5 DISCUSSÃO.....	23
6 CONCLUSÕES.....	26
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
8 ANEXOS.....	34

LISTA DE FIGURAS e TABELAS

Tabela 1: Espécies de <i>Leishmania</i> e forma clínica relacionada.	3
Figura 1: Forma promastigota. a- desenho esquemático. b- forma promastigota em MET (Microscopia eletrônica de transmissão).	4
Figura 2: Forma amastigota. a- desenho esquemático. b- forma amastigota de <i>Leishmania</i> spp. em MET	4
Figura 3: Ciclo de vida do parasito do gênero <i>Leishmania</i>	5
Figura 4: Desenho esquemático da ação da enzima iNOS.....	7
Figura 5: Isoformas da NOS.	8
Figura 6: Medida da produção do óxido nítrico através do método de reação de Griess em sobrenadante da cultura de <i>L.shawi</i> , <i>L.amazonensis</i> e <i>L.braziliensis</i> nas fases logarítmica (Log) e estacionária (Estacion.) de crescimento.....	16
Figura 7: Detecção da atividade da enzima óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) em promastigotas de <i>L.amazonensis</i> , <i>L.shawi</i> e <i>L.braziliensis</i> na fase logarítmica (A, C e E) e na fase estacionária (B, D e F) através da técnica de imunofluorescência.....	18
Figura 8: Detecção da atividade diaforásica da enzima NADPH em promastigotas de <i>L.amazonensis</i> , <i>L.shawi</i> e <i>L.braziliensis</i> na fase logarítmica (A, C e E) e na fase estacionária (B, D e F) através da técnica de citoquímica.	20
Figura 9: Detecção da Atividade Diaforásica da Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS) em macrófagos previamente estimulados e infectados com parasitas da espécie <i>L. amazonensis</i> e <i>L.shawi</i> ..	21
Figura 10: Medida da produção de NO em macrófagos estimulados com LPS (1µg/ml) e INF-γ (50U/ml) e não infectados e em macrófagos estimulados e infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) shawi</i> ..	22

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) constitui uma protozoose com elevada incidência na região Amazônica causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Este protozoário é um parasita intracelular obrigatório que desenvolve mecanismos para se defender da atividade microbicida dos macrófagos, tais como a inibição de produção do superóxidos e do óxido nítrico (NO). O óxido nítrico possui um papel importante na eliminação do parasito *in vitro* e *in vivo*. Este trabalho tem como objetivo analisar comparativamente a expressão da enzima óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) em três diferentes espécies de *Leishmania*, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *shawii* e *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. As formas promastigotas foram mantidas em meio RPMI 1640, suplementadas com 10% de soro bovino fetal (SBF) e mantidas em estufa a 27°C. Macrófagos foram cultivados em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e mantidos em estufa de CO₂ por 24h. A atividade diaforásica da enzima óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) foi analisada utilizando NADPH (1mM). A determinação da concentração de nitrito foi realizada utilizando-se o método de Griess. A técnica de imunofluorescência foi utilizada para a detecção da enzima (cNOS) na forma promastigota. Os ensaios de imunofluorescência e de Citoquímica mostraram que promastigotas das três espécies expressam a enzima. Entretanto, a espécie *L.braziliensis* apresentou maior reatividade quando comparada com *L. shawii* e *L.amazonensis*. Na dosagem de nitrito observou-se que a *L.braziliensis* apresentou uma concentração mais elevada de NO em comparação às outras espécies. Após a interação, observaram-se diferenças no padrão de resposta dos macrófagos infectados, onde a *L.amazonensis* foi capaz de inibir a produção de NO pelo macrófago enquanto que a *L.shawii* inibiu parcialmente essa produção. Estudos realizados por nosso grupo mostraram que a espécie *L. (V.) braziliensis* também possui a capacidade de inibir a produção de NO pelo macrófago. Sendo assim, os resultados sugerem que existe uma correlação entre a expressão da enzima cNOS e NO em diferentes espécies de *Leishmania* e a produção de NO pela célula hospedeira.

Palavras-chave: *Leishmania* sp, cNOS, óxido nítrico.

ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a parasitic disease, widely spread in most countries of Latin America, and caused by different species of the genus *Leishmania*. This protozoan is an obligate intracellular parasite that developed mechanisms to subvert the microbicidal activity of macrophages, such as inhibition of superoxide and nitric oxide (NO) production. In murine leishmaniasis, the nitric oxide plays a crucial role in the killing of parasites *in vitro* and *in vivo*. In this work, we analyzed the constitutive Oxido Nitric Synthase (cNOS) expression and NO production by three species of *Leishmania*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Parasites were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% of fetal bovine serum at 27°C. For detection of NADPH-diaphorasic activity, promastigotes were incubated with 1mM NADPH for 2 hours and analyzed in Interferential Microscopy (Axiophot Zeiss). *Leishmania* cNOS was identified in promastigotes using indirect Immunofluorescence assays, using polyclonal antibody anti-cNOS (Sigma) diluted 1:100 in PBS-BSA-Tw. The measure of the nitric oxide production was determinate in the supernatants of promastigotes cultures as nitrite form by adding Griess reagent. Immunofluorescence and cytochemistry assays showed that promastigotes of three *Leishmania* species are able to express cNOS. However, *L. braziliensis* had a strong reactivity when compared with *L. amazonensis* and *L. shawi*. By Nitrite measure was observed that the species were able to produce NO, but *L. braziliensis* interaction produced the highest amount of NO in comparison with the other species. About the interaction with the host cell we observed that, there were differences in the response of infected macrophages, where *L. amazonensis* was able to inhibit NO production by macrophages while *L. shawi* partially inhibited this production. Studies by our group showed that the species *L. (V.) braziliensis* also has the ability to inhibit NO production by macrophage. Thus, the results suggest that there is a correlation between the expression of the cNOS and NO in different species of *Leishmania* and NO production by the host cell.

Keywords: *Leishmania* sp, cNOS, Nitric Oxide.

1 INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são doenças causadas por tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, afetando dois milhões de pessoas todo ano na África, Ásia, América do Sul e Mediterrâneo (Gomes *et al.*, 2003). São caracterizadas por apresentarem diferentes manifestações clínicas, incluindo desde ulcerações cutâneas até formas viscerais que podem ser fatais, as quais estão relacionadas tanto com as espécies parasitas quanto com a saúde do hospedeiro (Foth *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2007). Na região amazônica, sete espécies diferentes do gênero *Leishmania* estão envolvidas com a etiologia da leishmaniose tegumentar humana – *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiff*, *L. (V.) lisoni*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) lindenbergi* (Silveira *et al.*, 2002).

A *Leishmania* é um protozoário intracelular obrigatório e apresenta-se sobre duas formas evolutivas: a forma promastigota, de vida extracelular; e a forma amastigota, intracelular obrigatório, presente, principalmente nas células fagocíticas mononucleadas (Lainson & Shaw, 1987). A inibição do crescimento ou destruição das leishmanias dentro de macrófagos é um mecanismo fundamental para eliminar ou reduzir a infecção. Recentemente foi demonstrado que a inabilidade de macrófagos exercerem efeito leishmanicida, parece estar relacionada com a capacidade de algumas espécies em inibir a produção de óxido nítrico (Gregory & Olivier, 2005; Balestieri *et al.*, 2002).

Dados recentes da literatura mostram que algumas espécies de *Leishmania* possuem a capacidade de produzir óxido nítrico a partir de uma forma constitutiva da enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS). Este pode ser um dos mecanismos pelo qual o parasito evade da resposta microbicida da célula hospedeira (Genestra *et al.*, 2006b).

1.1 AS LEISHMANIOSES

As Leishmanioses são doenças infecciosas que acometem milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2009). São causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à família *Trypanosomatidae*. É uma doença com características zoonóticas, afetando animais silvestres manifestando-se com diferentes formas clínicas. A transmissão ocorre através da picada de insetos fêmeas que podem pertencer a várias espécies de flebotomíneos, dependendo da localização geográfica (Reinthinger *et al.*, 2007) (Tabela 1).

1.1.1 LEISHMANIOSES CAUSADAS POR *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) braziliensis*.

As espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) shawi* são agentes causadores da leishmaniose cutânea localizada (LCL). Porém, causam outras formas clínicas, como a leishmaniose cutânea difusa (LCD) causada pela *Leishmania (L.) amazonensis*; e a leishmaniose cutaneomucosa (LCM) causada pela *Leishmania (V.) braziliensis* (Silveira *et al.*, 2004) (Tabela 1).

A lesão da LCL, forma clínica mais comum da doença pode curar espontaneamente, após algumas semanas ou meses, mas pode deixar marcas permanentes. A forma cutaneomucosa, causada por espécies do complexo *braziliensis*, inicia-se com úlceras simples de pele, as quais podem produzir metástases na região oronasal, causando destruição tecidual. A forma cutânea-difusa produz lesões crônicas e disseminadas e são mais difíceis de curar. Estas lesões múltiplas contêm número elevado de parasitos e são causadas pela *L. amazonensis*, no Brasil. Ao contrário da forma cutaneomucosa, que induz a um aumento da imunidade celular do hospedeiro, a leishmaniose cutânea difusa é caracterizada por ausência de resposta celular (Lainson, 1983). A leishmaniose cutânea começa com uma pápula ou nódulo no sítio de inoculação pelo mosquito infectado. A pápula aumenta lentamente para formar uma úlcera crônica. Uma ou mais úlceras podem se desenvolver, dependendo da espécie de *Leishmania*.

Tabela 1: Espécies de *Leishmania* e forma clínica relacionada. Fonte: REINTHINGER *et al.*, 2007 (modificado).

	Forma Clínica	Distribuição Geográfica
<i>Leishmania</i> spp. do Novo Mundo		
<i>L (Viannia) braziliensis</i>	LCL, cutaneomucosa	Américas do Sul e Central, México
<i>L (Viannia) panamensis</i>	LCL, cutaneomucosa	Américas do Sul e Central
<i>L (Viannia) peruviana</i>	LCL	Peru
<i>L (Viannia) guyanensis</i>	LCL	América do Sul
<i>L (Viannia) lainsoni</i>	LCL	América do Sul
<i>L (Viannia) colombiensis</i>	LCL	América do Sul
<i>L (Viannia) shawi</i>	LCL	América do Sul
<i>L (Viannia) lindenbergi</i>	LCL	América do Sul
<i>L (Leishmania) amazonensis</i>	LCL, LCD	América do Sul
<i>L (Leishmania) mexicana</i>	LCL, LCD	América Central, México e EUA
<i>L (Leishmania) pifanoi</i>	LCL	América do Sul
<i>L (Leishmania) venezuelensis</i>	LCL	América do Sul
<i>L (Leishmania) garnhami</i>	LCL	América do Sul
<i>L. (Leishmania) chagasi</i>	Visceral	Américas do Norte, Central e Sul
<i>Leishmania</i> spp. do Velho Mundo		
<i>L (Leishmania) aethiopica</i>	LCL, LCD	Etiópia, Quênia
<i>L (Leishmania) killicki</i>	LCL	África do Norte
<i>L (Leishmania) major</i>	LCL	Ásia, África
<i>L (Leishmania) tropica</i>	LCL	Ásia, África
<i>L (Leishmania) donovani</i>	Visceral, LCL	Ásia, África
<i>Leishmania</i> spp. do Novo e Velho Mundo		
<i>L (Leishmania) infantum</i>	Visceral, LCL	Europa, África, Américas central e Sul

LCL=Leishmaniose Cutânea Localizada; LCD=Leishmaniose Cutânea Difusa.

1.1.2 Agente Etiológico – Morfologia

Os protozoários do gênero *Leishmania* são digenéticos, apresentando as formas promastigota e amastigota (Lainson & Shaw, 1987).

A forma promastigota possui corpo celular e flagelo alongado. Essa forma tem ciclo extracelular, sendo encontrada no tubo digestivo do vetor (Figura 1). A forma amastigota, que é tipicamente ovóide ou esférica, sem flagelo livre, encontrada no citoplasma dos macrófagos dos hospedeiros vertebrado (Vannier – Santos *et al.*, 2002) (Figura 2). Além disso, em ambas as formas há presença do cinetoplasto que possui um arranjo complexo de DNA mitocondrial, característico de sua classe *Kinetoplastida* (Lainson & Shaw, 1987; Cavalcanti *et al.*, 2008).

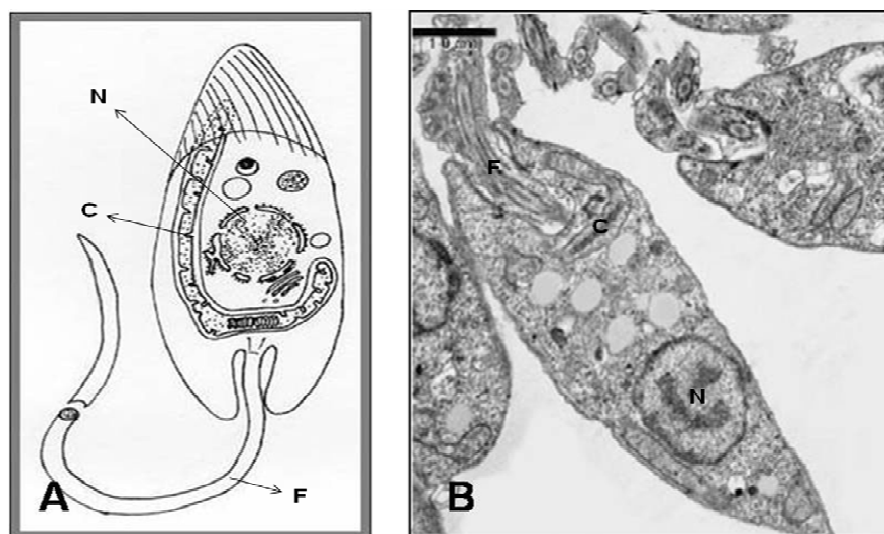


Figura 1. Forma promastigota. a- desenho esquemático. b- forma promastigota em MET (Microscopia eletrônica de transmissão). Fonte: (Balanco *et al.*,1998). F-flagelo, C-cinetoplasto e N-núcleo.

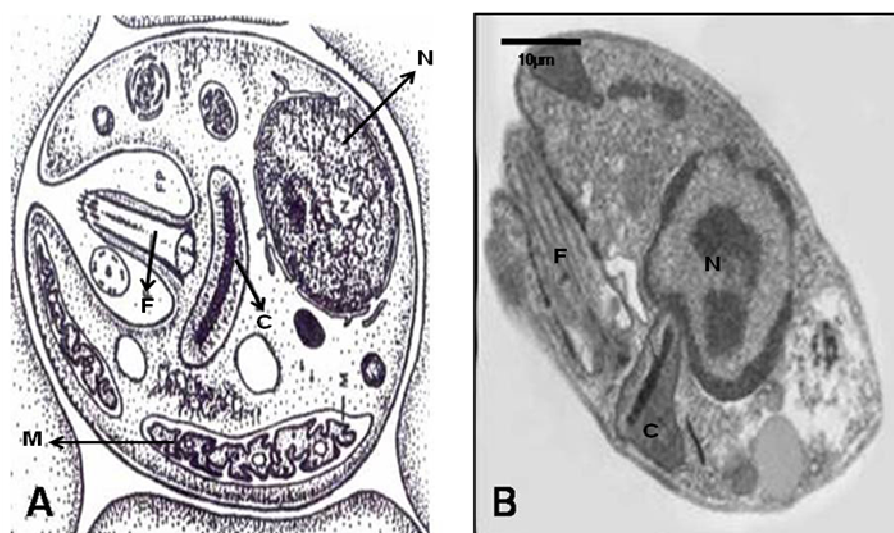


Figura 2. Forma amastigota. a- desenho esquemático. b- forma amastigota de *Leishmania* spp. em MET. Fonte: (Balanco *et al.*,1998). F-flagelo, C-cinetoplasto, M-mitocôndria, N-núcleo.

1.1.3 CICLO

Os parasitos do gênero *Leishmania* são protozoários heteroxenos, que em seu ciclo evolutivo apresenta um hospedeiro invertebrado, o inseto da subfamília *Phlebotominae*, e um hospedeiro mamífero, que pode ser o homem (Lainson & Shaw, 1987).

Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do flebotomíneo ingere formas amastigotas circulantes ou que estão na pele, no interior de macrófagos que chegarão ao intestino médio do vetor. Neste local, as amastigotas transformam-se em promastigotas procíclicas. Após, aproximadamente, cinco dias as promastigotas procíclicas desenvolvem-se em promastigotas metacíclicas, sendo esta infectante para o hospedeiro mamífero (Sacks, 2001). Após penetrarem no hospedeiro, as promastigotas metacíclicas serão reconhecidas na pele por células do sistema imune e mantidas no fagolisossomo, onde por influência de enzimas e alterações do pH e temperatura sofrerão modificações morfológicas adquirindo a forma arredondada da amastigota (Serenio *et al.*, 2007). Essa forma passa a se multiplicar no interior das células fagocíticas até a ruptura, passando a infectar novos macrófagos e também novos vetores se estiverem presentes no mesmo habitat do homem infectado, mantendo o ciclo com o homem como hospedeiro e os animais, muitas vezes domésticos, como reservatórios (Bailey *et al.*, 2007) (Figura3).

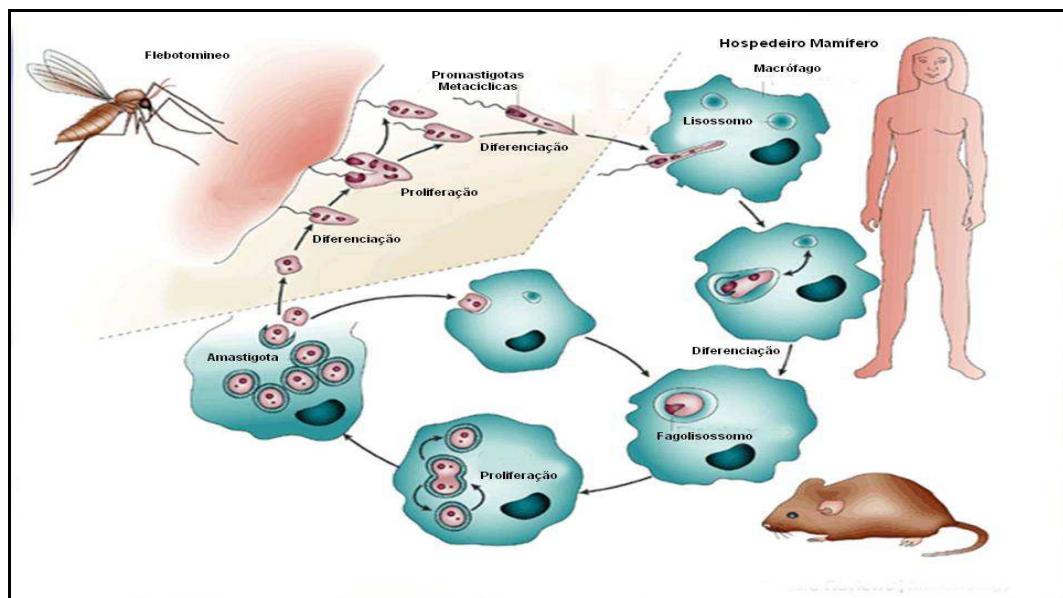


Figura 3. Ciclo de vida do parasito do gênero *Leishmania*. FONTE: Sacks et al.; 2002 (modificado).

1.2 A CÉLULA HOSPEDEIRA

O protozoário do gênero *Leishmania* é um parasita intracelular obrigatório que se multiplica, principalmente, no interior de macrófagos do hospedeiro mamífero (Rittig & Bogdan, 2000; Handman & Bullen, 2002).

No sistema imune, os macrófagos juntamente com os neutrófilos, são as principais células fagocíticas do organismo, que desempenham uma função vital no reconhecimento de microorganismos patogênicos e na resposta contra esses patógenos (Murrey, 1998).

A fagocitose é uma forma de endocitose por meio da qual o microorganismo e células mortas são ingeridos através das grandes vesículas endocíticas, os fagossomos (Alberts, 2004). Este processo inicia-se com o reconhecimento do parasito através de receptores presentes na membrana dos macrófagos. Dentre os mecanismos com os quais os macrófagos reconhecem o parasito, estão os receptores para o complemento. O reconhecimento se dá, principalmente, nos receptores CR1 e CR3 (Ambrosio & De Messias-Reason, 2005). Além disso, receptores na superfície de macrófagos, específicos para o fosfolipídio fosfatidilserina, são igualmente importantes para o reconhecimento de parasitas do gênero *Leishmania* (Van Zandbergen *et al.*, 2006).

Após o reconhecimento, o microorganismo é fagocitado iniciando o processo de destruição do parasito por enzimas no interior dos fagossomos, ou por intermediários tóxicos formados por macrófagos ativados (Stafford *et al.*, 2002).

Durante a fagocitose, os macrófagos produzem uma grande quantidade de radicais de oxigênio (ROS) como íons superóxidos (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), reação conhecida como “Burst Oxidativo” (Finald *et al.*, 2006). Os efeitos citotóxicos do “Burst Oxidativo” se devem, em parte, a capacidade que possuem de reagir com outros produtos antimicrobicidas, gerando assim moléculas mais reativas, como por exemplo, a reação de O_2^- com óxido Nítrico (NO) formando radicais hidroxila ($OH^\cdot$) (Robinson *et al.*, 2004). De acordo com Descoteaux *et al.* (2006), estes compostos são tóxicos contra promastigotas de *Leishmania*.

Outro importante mecanismo microbicida de macrófagos é a produção de Óxido Nítrico (NO). A síntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina pela enzima iNOS, utilizando o NADPH como cofator (Marleta, 1993), (Figura 4). O NO é uma molécula altamente reativa com potente capacidade microbicida (Winberg *et al.*, 2007), e está ausente em macrófagos inativados, sendo ativada, principalmente, por meio do LPS e $INF-\gamma$ (Hortelano, 2003). Além disso, esta

molécula é sinalizadora para reações moleculares no interior da célula, como ativação da guanilato ciclase e posterior liberação de Ca^{++} intracelular (Lo *et al.*, 2002; Winberg *et al.*, 2007).

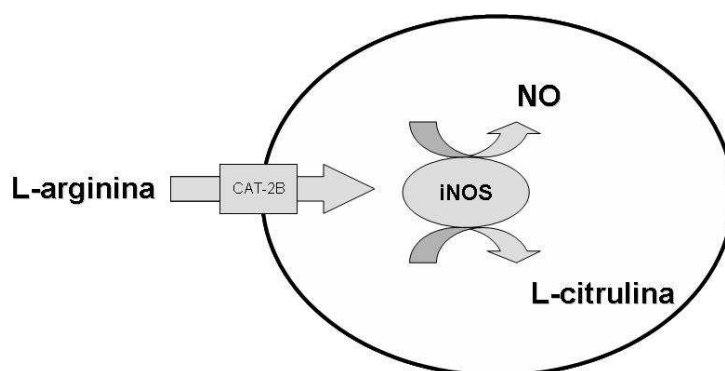


Figura 4. Desenho esquemático da ação da enzima iNOS. A L-arginina é transportada por uma proteína de membrana para o interior da célula, sendo convertida em NO e L-citrulina pela enzima iNOS.

Existem três isoformas da enzima óxido nítrico sintase: duas constitutivas e uma induzível, recebendo as siglas respectivas de cNOS e iNOS. A isoforma constitutiva compreende a NOS neuronal e a NOS endotelial, que são produzidas continuamente pela célula e são dependentes do íon Cálcio (Ca^{2+}) e de Calmodulina, está envolvida na sinalização celular; e a isoforma induzível (iNOS), independente de Ca^{2+} , não é expressa sob condições normais, produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (Groves *et al.*, 2000; Seabra *et al.*, 2002).

A isoforma induzida requer algumas horas para ser expressa, mas, uma vez sintetizada, libera quantidades maiores de NO que a cNOS e a produção deste continua indefinidamente até que a L-arginina ou os co-fatores necessários para sua síntese sejam reduzidos ou ocorra à morte celular (Dusting *et al.*, 1995).

A primeira demonstração da existência da via do NO em Tripanossomatídeos foi realizada em 1995 por Paveto e Colaboradores, em *Trypanosoma cruzi* (Paveto *et al.* 1995). Piacenza *et al.* (2001), demonstraram que o metabolismo do NO medeia proteção contra a morte apoptótica. Além disso, estudos realizados por Genestra *et al.* (2006b), relataram à produção de NO por promastigotas de *Leishmania* sp. e a participação do NO durante a interação da *L.amazonensis* com a célula hospedeira.

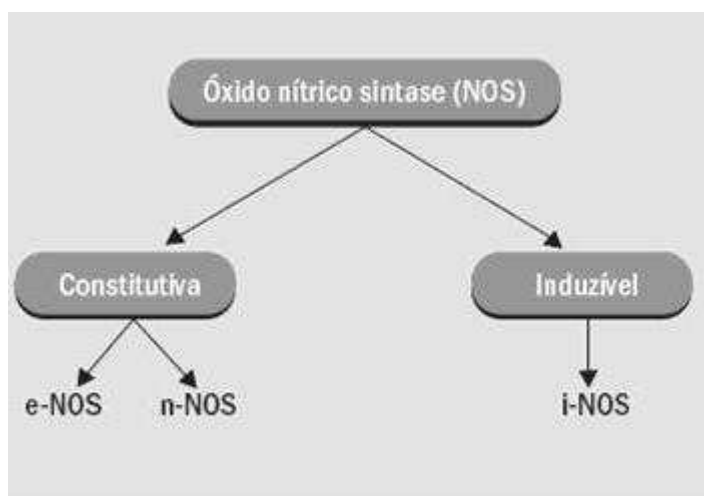


Figura 5 - Isoformas da NOS. FONTE: (Dusse *et al.*, 2003).

1.3 A INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório. O processo de fagocitose requer uma interação entre receptores especializados na superfície de células fagocíticas e ligantes complementares na membrana da célula alvo. Esta interação induz a formação de pseudópodes que irão envolver o microorganismo (Rittig & Bogdan, 2000).

A fagocitose das promastigotas de *Leishmania* ocorre através da ligação do parasito a receptores presentes na superfície dos macrófagos. Dentre os receptores envolvidos estão os receptores para o complemento CR, CR1, CR3, iniciando com isso a formação de pseudópodes que culminará com a internalização do parasito, formando, assim, um fagossomo (Gruenheid & Finlay, 2003).

Para evitar a lise pelo complemento, o parasito deve ser rapidamente fagocitado. A protease Gp63 é um potente fator de virulência durante a interação com a célula hospedeira e também com o sistema do complemento atua diretamente sobre a proteína C3, inibindo a cascata imunológica (Joshi *et al.*, 2002). Além disso, a Gp63 também é capaz de inativar a iNOS de macrófagos infectados com *L. major* (Winberg *et al.*, 2007). Esta ligação também é responsável com que o macrófago não dispare seu mecanismo microbicida através do “burst oxidativo”, favorecendo o estabelecimento da infecção no hospedeiro mamífero (Neves *et al.*, 2005).

Além da Gp63, existem na superfície do parasito moléculas de fundamental importância para o sucesso da infecção como o LPG, molécula capaz de atuar na inibição da

fusão do lisossomo, além de causar alterações no retículo endoplasmático da célula hospedeira conferindo assim proteção contra degradação do parasito (Guelrard *et al.*, 2007); açúcares (manose, galactose) auxiliam na fagocitose pelas células hospedeiras e a fosfatidilserina, um fosfolipídio presente na membrana plasmática das promastigotas que possui alta especificidade com receptores na superfície de macrófagos. Esta molécula atua estimulando a atividade fagocítica do macrófago, porém inibindo a produção de NO, IL-10 e TGF- β e, conseqüentemente, a reação inflamatória (Wanderley *et al.*, 2006).

Estes mecanismos demonstram que o protozoário *Leishmania* manipula as funções de sua célula hospedeira de várias maneiras.

1.4 JUSTIFICATIVA

As Leishmanioses são doenças que acometem milhões de pessoas em todo o mundo. São causadas por protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania* (Libusová *et al.*, 2004). A transmissão ocorre através da picada de insetos hematófagos, conhecidos como flebotomíneo, pertencentes a 30 espécies diferentes (WHO, 2009), dependendo da sua localização geográfica.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as Leishmanioses afetam aproximadamente dois milhões de pessoas no mundo, sendo uma das seis doenças tropicais de maior relevância no mundo (WHO, 2009).

O Brasil está entre os cinco países com maior número de casos desta endemia, representando um grande problema de saúde pública, com destaque para a região Norte, Centro-Oeste e Nordeste (Vieira *et al.*, 2007).

O protozoário do gênero *Leishmania* é um parasita intracelular obrigatório que se multiplica, principalmente, no interior de macrófagos do hospedeiro mamífero (Rittig & Bogdan, 2000; Handman & Bullen, 2002). A inibição do crescimento ou a destruição da *Leishmania* dentro de macrófagos é um mecanismo fundamental para eliminar ou reduzir a infecção. A habilidade de resistir aos processos microbicidas da célula hospedeira é uma importante característica dos parasitas da espécie *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis*. Entretanto, algumas espécies como *L. (V.) shawi* apresentam menor capacidade em resistir a estes mecanismos microbicidas.

Estudos envolvendo moléculas sintetizadas por parasitas são de fundamental importância para avaliar a função e a contribuição destas para a infectividade do parasita. Além disso, ensaios envolvendo essas moléculas podem ser úteis no diagnóstico da leishmaniose e na identificação das várias cepas de uma determinada forma clínica da doença.

Portanto, existe a necessidade de identificar fatores intrínsecos das diferentes espécies de *Leishmanias* que incidem na região, que possam favorecer a evasão destes mecanismos microbicidas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar comparativamente a presença da enzima Óxido Nítrico Sintase constitutiva (cNOS) e a produção de óxido nítrico nas espécies *Leishmania (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) shawi*.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Detecção citoquímica e imunocitoquímica da enzima cNOS nas diferentes espécies de *Leishmania*;
- ✓ Medir produção de óxido nítrico no sobrenadante de cultura das diferentes espécies analisadas;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DO PARASITO

As formas promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (IFLA/67/BR/PH8), *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (M17593) e *Leishmania* (*Viannia*) *shawii* (MHOM/2001/BR/M19703) foram obtidas em meio NNN do programa de leishmaniose do pelo Instituto Evandro Chagas, Belém - Pará. As formas promastigotas foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com soro bovino fetal (SBF) a 10% e GPPS a 1% (Glutamina 0,2M; Ácido Pirúvico 0,0125 M; Penicilina/Estreptomicina 1%) e mantidos a 27°C em estufa B.O.D. O repique da cultura foi feito na fase estacionária da curva de crescimento.

3.2 OBTENÇÃO E CULTIVO DA CÉLULA HOSPEDEIRA

Macrófagos peritoneais foram obtidos a partir de camundongos albinos (*Mus musculus*). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a coleta dos macrófagos peritoneais foi feita através de lavagem da cavidade peritoneal com solução de Hanks estéril, utilizando seringa e agulhas estéreis. O material aspirado foi concentrado por centrifugação a 1.500 rpm durante 10 minutos a uma temperatura de 4 °C. O sedimento foi ressuspenso em meio de cultura sem soro. A contagem das células foi feita em Câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada de acordo com o número de células utilizadas em cada experimento. Os macrófagos foram então semeados em placas de cultura e incubados à 37 °C em estufa contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂, durante uma hora para adesão em lamínula. Após esse tempo foi feita uma lavagem com solução salina de fosfato estéril (PBS) pH 7,2, para remoção de células que não aderiram, e em seguida foi adicionado meio DMEM suplementado com 10% de SBF. As células foram, então, mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

3.3 MEDIDA DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM SOBRENADANTE DE CULTURA DAS DIFERENTES ESPÉCIES

A determinação da concentração de nitrito no meio de cultura é uma forma indireta de se determinar a concentração de óxido nítrico (NO) produzido pelos parasitos. Este procedimento foi realizado utilizando-se método de Griess, que consiste em adicionar 50 µl do reagente de Griess (sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% e Naphtylenediamina a 0,1% em água destilada) a 50 µl do sobrenadante das culturas com *L.(L.) amazonensis*, *L.(V.) braziliensis* e *L.(V.) shawi*. A leitura foi feita em espectrofotômetro sobre um comprimento de onda de 570 nm, e a concentração de nitrito é expressa em µM.

3.4 DETECÇÃO DA ATIVIDADE DIAFORÁSICA DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE CONSTITUTIVA (CNOS) ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CITOQUÍMICA NAS DIFERENTES ESPÉCIES

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) shawi* na fase estacionária e logarítmica foram aderidas em lamínula coberta com 0.1% de poli-L-lisina, fixadas com paraformaldeído a 4% durante trinta minutos, e em seguida lavadas com PBS. As células foram incubas em 50 mM tampão Tris - HCl contendo 1mM de NADPH, 0,4 mg/ml de NBT e 0,2% de Triton X-100 (Tracey et al., 1993). As lamínulas foram incubadas a 37°C em condições de escuridão, por 2 horas. Em seguida, lavadas com tampão Tris – HCl e montadas para visualização em microscópio óptico.

3.5 DETECÇÃO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE CONSTITUTIVA (CNOS) POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis*, *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) shawi* na fase logarítmica e estacionária foram aderidas em uma lamínula coberta com 0.1% de poli-L-lisina, e fixadas por imersão em uma solução contendo: 3,7% de paraformaldeído e 0,1% de glutaraldeído, em tampão PHEM (5mM cloreto de Magnésio, 70 mM cloreto de potássio, 10 mM EGTA, 20 mM HEPES, 60 mM PIPES), 0,1 M , pH 7,2 por um período de 30 minutos a temperatura ambiente e posteriormente permeabilizados com 0,1% de Triton X 100 durante 3 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas no tampão PBS com 1% de Soro Albumina Bovina (PBS-BSA 1%) por 20 minutos e incubadas por 15 minutos em PBS contendo 50 mM

NH₄Cl. Após lavagem em PBS-BSA 1%, as células foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpo policlonal anti-cNOS (Sigma) diluído 1:100 em tampão PHEM e posteriormente uma segunda incubação com anticorpo secundário obtido em cabra anti IgG de coelho, marcado com Alexa 488 nm (Molecular Probes) diluído 1:100 no mesmo tampão. As lamínulas foram montadas em lâmina contendo anti-fading e observadas em Microscópio Laser Confocal LSM 5 Pascal Zeiss. Como controle negativo foi feita omissão do primeiro anticorpo.

3.6 MEDIDA DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *L. (V.) SHAWI* E *L. (L.) AMAZONENSIS*

Este procedimento foi feito utilizando-se método de Griess, que consiste em adicionar 500 µl do reagente de Griess (sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% e Naphtylenediamina a 0,1% em água destilada) a 500 µl do sobrenadante dos macrófagos infectados e não infectados com *L.(L.) amazonensis* e *L.(V.) shawi*. A leitura foi feita em espectrofotômetro sobre um comprimento de onda de 540 nm, e a concentração de nitrito foi expressa em µM.

3.7 DETECÇÃO DA ATIVIDADE DIAFORÁSICA DA ENZIMA (INOS) EM MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *L. (V.) SHAWI* E *L. (L.) AMAZONENSIS*

Macrófagos peritoneais previamente estimulados com LPS (1mg/ml) e INF - γ (50 U/ml) durante 24 horas foram infectados com *L. amazonensis* e *L. shawi* na proporção de 10 parasitas por macrófago, durante 2 horas. As leishmanias não fagocitadas foram removidas com lavagem utilizando solução de PBS e a cultura de macrófagos infectados foi mantida durante 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após este tempo, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% durante trinta minutos, e em seguida lavadas com PBS. As células foram então incubas em 50 mM tampão Tris - HCl contendo 1mM de NADPH, 0,4 mg/ml de NBT e 0,2% de Triton X-100 (Tracey et al., 1993). As lamínulas foram incubas a 37°C protegidas da luz por 2 horas. Em seguida, foram lavadas com tampão Tris – HCl e montadas para visualização em microscópio óptico.

Como controle negativo e positivo da reação foram utilizadas culturas de macrófagos sem estímulo e estimuladas com LPS (1mg/ml) e INF- γ (50U/ml), respectivamente.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados utilizando o Biostat 5.0. O teste usado foi a análise de variância, ANOVA, e Teste t de Student, com $p < 0,05$ (Ayres *et al.*, 2007).

4 RESULTADOS

4.1 MEDIDA DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM SOBRENADANTE DE CULTURA DAS DIFERENTES ESPÉCIES DE LEISHMANIA

Foi observado que a espécie *L.(V.) braziliensis* apresentou uma produção maior de NO comparada com as espécies *L.(V) shawi* e *L. (L.) amazonensis* (Figura 6). Também foi observado que todas as espécies apresentaram maior concentração de nitrito na fase logarítmica (fase de crescimento) quando comparada à fase estacionária.

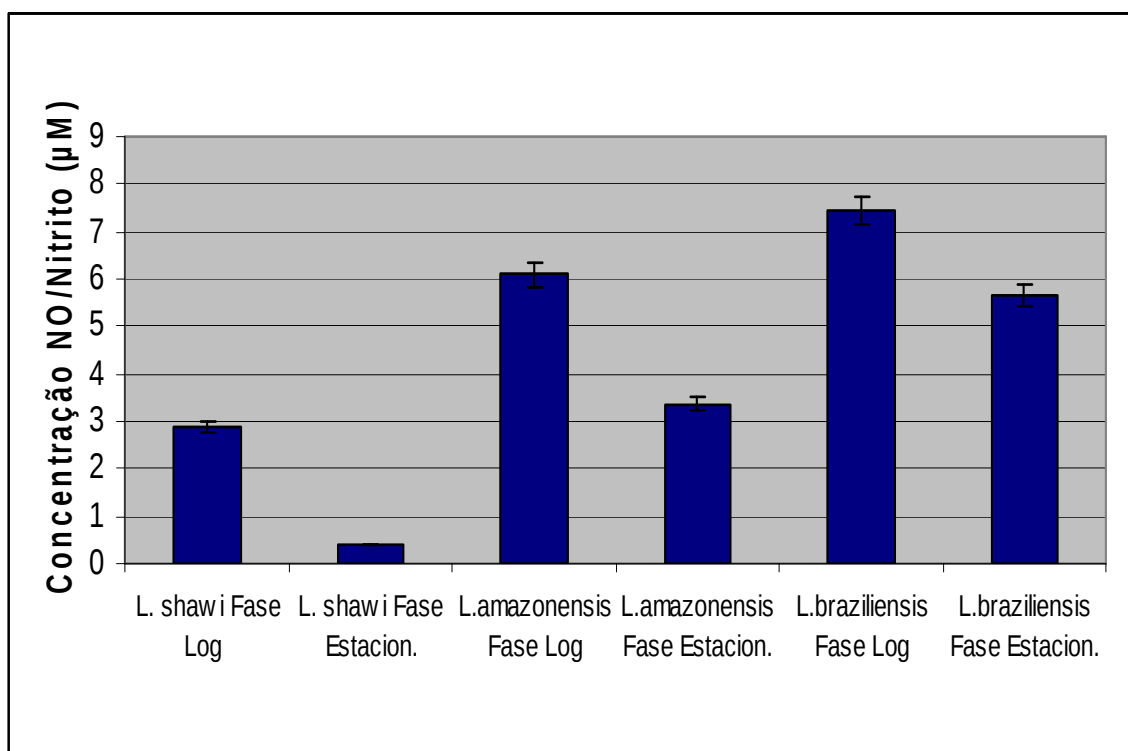


Figura 6: Medida da produção do óxido nítrico através do método de reação de Griess em sobrenadante da cultura de *L.shawi*, *L.amazonensis* e *L.braziliensis* nas fases logarítmica (Log) e estacionária (Estacion.) de crescimento.

4.2 DETECÇÃO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE CONSTITUTIVA (CNOS) ATRAVÉS DA TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Nos ensaios de imunofluorescência (Figura 7), foi possível observar que as formas promastigotas das três espécies de *Leishmania* expressaram a enzima cNOS. Entretanto, a espécie *L.braziliensis* (Figs 7-E e F) apresentou uma maior reatividade comparada com as espécies *L.shawi* (Figs 7-C e D) e *L.amazonensis* (Figs 7-A e B).

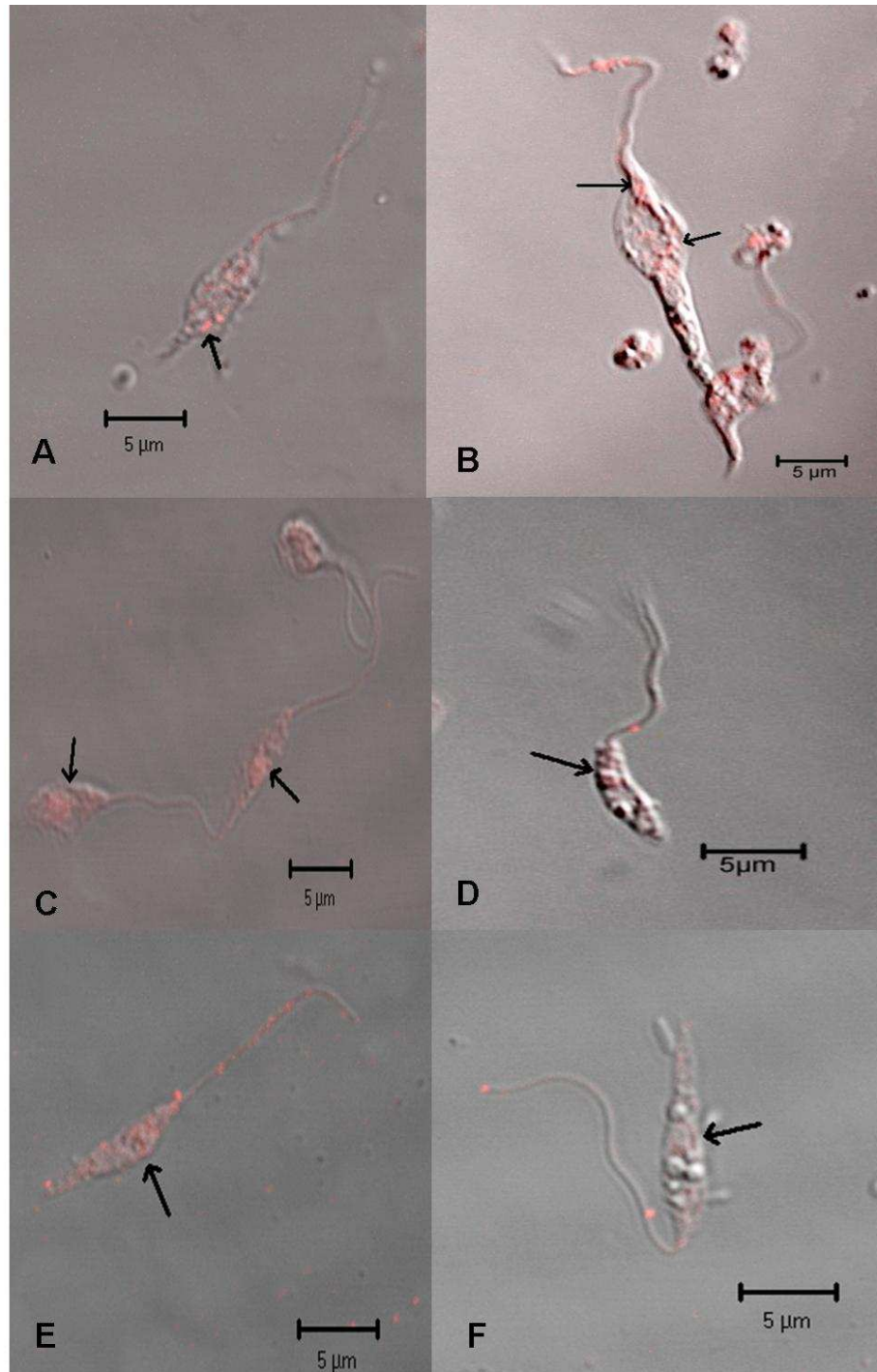


Figura 7: Detecção da atividade da enzima óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) em promastigotas de *L.amazonensis*, *L.shawi* e *L.braziliensis* na fase logarítmica (A, C e E) e na fase estacionária (B, D e F) através da técnica de imunofluorescência. (A-B) *L.amazonensis*, (C-D) *L. shawi* e (E-F) *L.braziliensis*. Notar que todas as espécies expressam a enzima cNOS, porém mais intensa na fase logarítmica quando comparado com a fase estacionária.

4.3 DETECÇÃO DA ATIVIDADE DIAFORÁSICA DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE CONSTITUTIVA (CNOS) ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CITOQUÍMICA

Nos ensaios de citoquímica (Figura 8) foi possível observar que a espécie *L.braziliensis* (Figs 8-E e F) apresentou uma maior reatividade comparada com as espécies *L.shawi* (Figs 8-C e D) e *L.amazonensis* (Figs 8-A e B). Também foi observado que todas as espécies possuem maior reatividade enzimática na fase Logarítmica de crescimento quando comparada à fase estacionária.

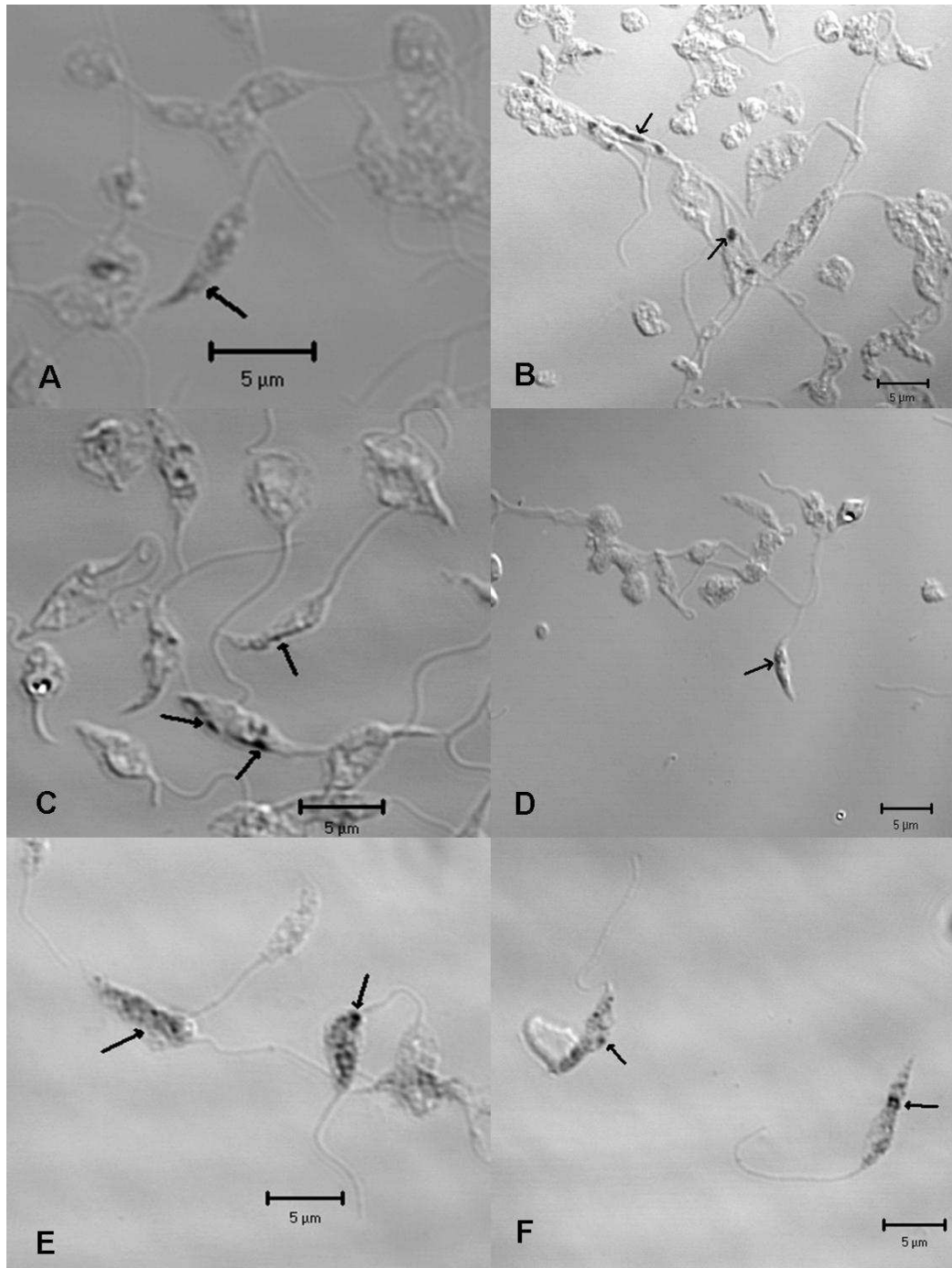


Figura 8: Detecção da atividade diaforásica da enzima NADPH em promastigotas de *L.amazonensis*, *L.shawi* e *L.braziliensis* na fase logarítmica (A, C e E) e na fase estacionária (B, D e F) através da técnica de citoquímica. (A-B) *L.amazonensis*, (C-D) *L. shawi* e (E-F) *L.braziliensis*. Notar maior marcação nos parasitos da fase logarítmica e maior expressão da enzima nos parasitas de *L.braziliensis*.

4.4 DETECÇÃO DA ATIVIDADE DIAFORÁSICA DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA (iNOS) DURANTE INTERAÇÃO COM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

Durante a interação com a célula hospedeira as espécies foram capazes de reduzir a produção de óxido nítrico pelo macrófago (Figura 9).

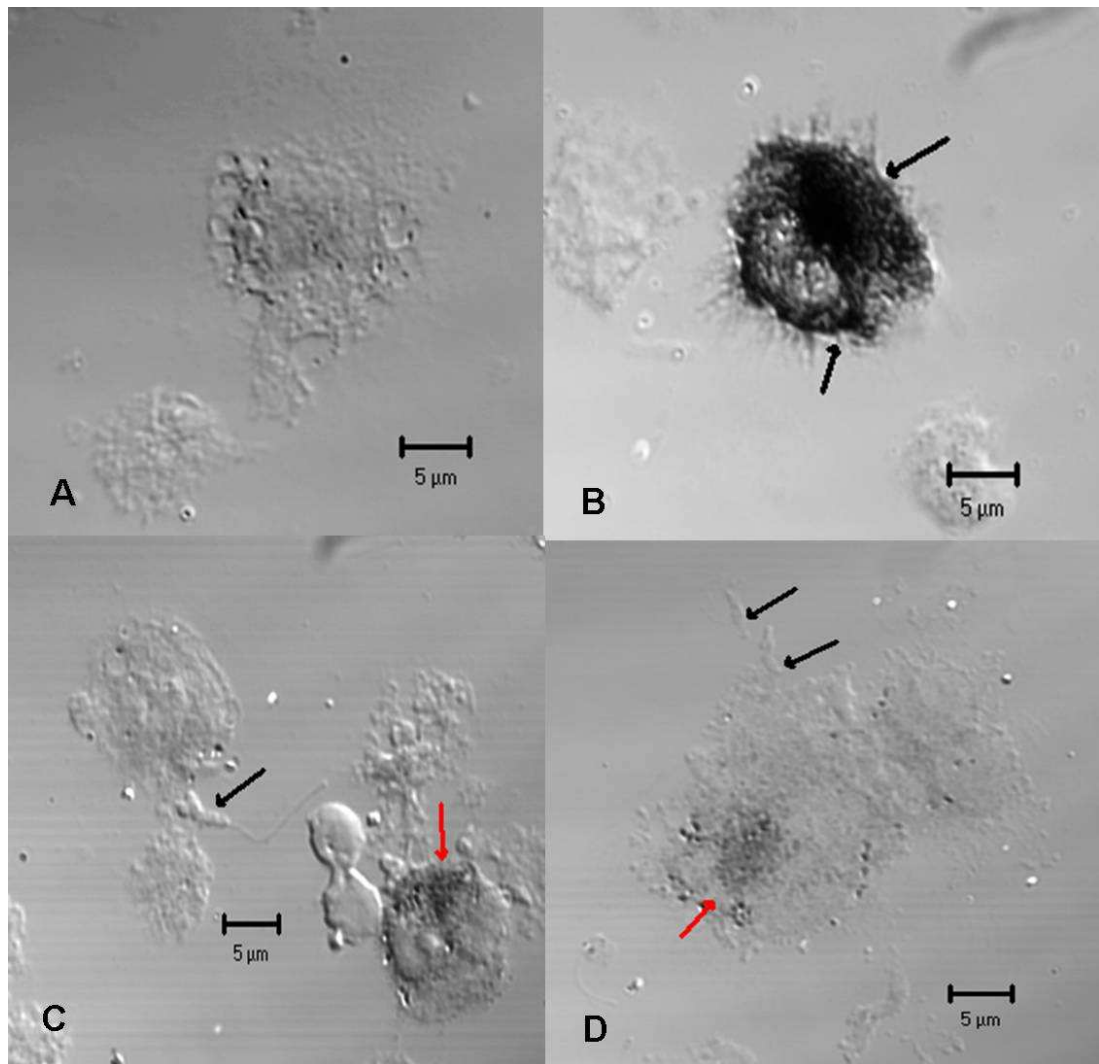


Figura 9: Detecção da Atividade Diaforásica da Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS) em macrófagos previamente estimulados e infectados com parasitas da espécie *L. amazonensis* e *L. shawi*. (A) Macrófagos não infectados. Ausência de reação. (B) Macrófagos estimulados. Observar forte marcação por toda célula (setas). (C) Macrófagos infectados com *L. amazonensis* (seta preta). Observar a ausência de reação em células infectadas quando comparado com célula não infectada (seta vermelha). (D) Macrófagos infectados com *L. shawi* (seta preta). Observar pequena reatividade na célula infectada (seta vermelha).

4.5 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *L. (V.) SHAWI* E *L. (L.) AMAZONENSIS*

Foi verificada a produção de NO em macrófagos previamente estimulados com INF- γ e LPS e infectados com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) shawi*. Na figura 10 é possível observar que ocorreu uma diminuição significativa na produção de NO em macrófagos infectados com ambas as espécies quando comparados com macrófagos não infectados. Entretanto, a produção de NO foi menor em macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* quando comparados com macrófagos infectados com *L. (V.) shawi*.

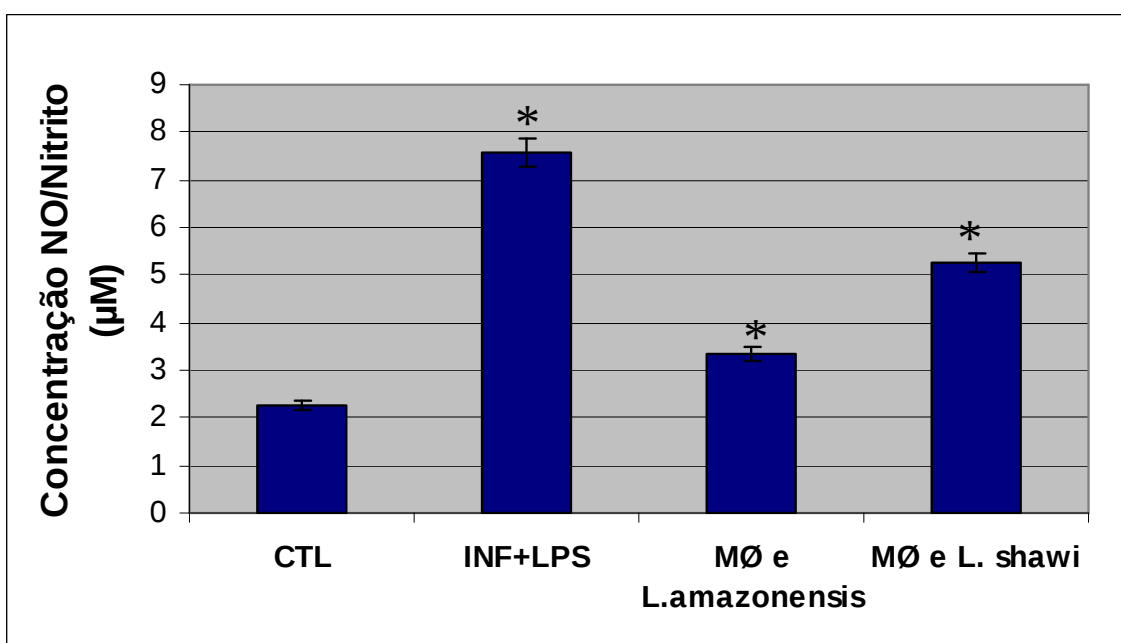


Figura 10: Medida da produção de NO em macrófagos estimulados com LPS (1µg/ml) e INF- γ (50U/ml) e não infectados e em macrófagos estimulados e infectados com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) shawi*. Foi utilizado ANOVA, t Student (*) diferença entre células estimuladas, células estimuladas e infectadas em relação ao controle, $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios que se multiplicam, principalmente, no interior de macrófagos do hospedeiro mamífero (Rittig & Bogdan, 2000). O estabelecimento da infecção e a sobrevivência do parasito no interior de uma célula fagocítica requer habilidades para burlar o sistema de defesa da célula hospedeira.

Dados da literatura mostram que diferentes espécies de *Leishmania* possuem mecanismos diferentes de evasão (Kima, 2007). Dentre estes mecanismos, destacam-se: inibição do “burst oxidativo”, diminuição da expressão da enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS) e, conseqüentemente, de Óxido Nítrico (NO) (Bogdan & Röllinghoff, 1997; Alexander *et al.*, 1999; Stafford *et al.*, 2002).

Nossos resultados demonstraram que promastigotas das três espécies analisadas são capazes de expressar a enzima cNOS. No entanto, a espécie *L. (V.) braziliensis* apresentou uma forte reatividade da atividade diaforásica da enzima cNOS quando comparada com as espécies *L. shawi* e *L. amazonensis*. Estes resultados sugerem que pode haver uma relação da expressão da enzima cNOS com a severidade da lesão causada por *L. braziliensis* quando comparada as outras espécies.

Genestra *et al.* (2003c) demonstraram que promastigotas das espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*, produzem NO, a partir de uma enzima constitutiva, a cNOS, e que a produção de NO pela espécie *L. braziliensis*, na fase infectiva, foi elevada quando comparada com as espécies *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Além de que com aumento do número de passagens, ou seja, com a diminuição das formas metacíclicas, havia uma redução na produção NO nas três espécies de *Leishmania* estudadas.

Em tripanossomatídeos, Piacenza *et al.* (2001), demonstraram que a produção de NO, por epimastigotas de *T. cruzi*, participa na proteção contra a morte apoptótica. Genestra *et al.*; (2003b) demonstraram que promastigotas de *L. amazonensis* pré-incubadas com L-NAME, um inibidor irreversível da enzima óxido nítrico constitutiva (cNOS), reduzia a infecção em macrófagos em 61% em 24h e 19% após 48h. Estes dados demonstram que a via NO, no parasito, é importante para o estabelecimento da infecção.

Em relação à medida da produção de óxido nítrico, nossos dados demonstraram que as formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* apresentaram maior produção de óxido nítrico, em sobrenadante de cultura, comparado *L. (V.) shawi* e *L. (L.) amazonensis*. Também foi observado que todas as espécies estudadas apresentaram maior produção de óxido nítrico na fase logarítmica de crescimento quando comparada à fase estacionária de crescimento.

A maior expressão dessa enzima na fase logarítmica pode estar relacionada à maior necessidade do íon Cálcio (Ca^{2+}) para o desenvolvimento do parasito, uma vez que a enzima cNOS é dependente de Ca^{2+} . Prasad *et al.*, (2001) sugerem uma relação entre o metabolismo do cálcio e a sobrevivência do parasito e com o ciclo de vida do patógeno. Entretanto, a função do cálcio como biomodulador no ciclo de vida de protozoários e outros microorganismos não está completamente esclarecida.

Em relação à interação das espécies com a célula hospedeira foi verificada uma diferença na produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongo e previamente estimulados com LPS e INF – γ , infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) shawi*, foi possível observar que a espécie *L. (L.) amazonensis* apresentou a capacidade de inibir a produção de NO pelo macrófago, enquanto a espécie *L.(V.) shawi* não possui a capacidade de inibir totalmente essa produção. Estudos realizados por nosso grupo mostraram que a espécie *L. (V.) braziliensis* também possui a capacidade de inibir a produção de NO pelo macrófago. Estes resultados evidenciam que a resposta microbicida dos macrófagos depende da espécie de *Leishmania* envolvida e que o estabelecimento da infecção e sobrevivência do parasito no interior da célula hospedeira estão relacionados com a capacidade do parasito em modular os mecanismos de defesa do macrófago.

A atividade iNOS com produção de Óxido Nítrico (NO) é um importante mecanismo de defesa da célula hospedeira contra multiplicação de parasitos intracelulares (Dusse *et al.*, 2003 Winberg *et al.*, 2007). Entretanto, como mecanismo de escape, alguns protozoários intracelulares como *Toxoplasma gondii* e *Leishmania spp.* inibem a produção de NO em macrófagos ativados (Seabra *et al.*, 2002; Balestieri *et al.*, 2003).

Balestieri *et al.*, 2003 demonstraram que a inibição da produção de NO por *L. (L.) amazonensis* parece ser resultado de alterações no transporte intracelular de L-arginina, substrato utilizado pela enzima iNOS na reação de produção de NO, ou ainda pela interferência na dimerização da enzima, com conseqüente redução de co-fatores associados, necessário para a formação da molécula. A capacidade de inibir a síntese de NO pode estar relacionado com a ativação de outras vias de sinalização intracelular, na célula hospedeira, causando comprometimento da formação da iNOS (Proudfoot *et al.*; 1995,1996).

Balestieri *et al.* (2002) demonstraram que a baixa produção de NO por macrófagos J774-G8 infectados *L. amazonensis* e estimulados com LPS pode estar relacionada com a redução na atividade da enzima iNOS, sugerindo que os parasitas afetam a via de sinalização que induz a produção de NO. Além disso, foi demonstrado que esta espécie

inibe a expressão de $\text{TNF} - \alpha$ e estimula a produção de $\text{TGF} - \beta$, que inibe a expressão da proteína iNOS, e conseqüentemente a produção de NO (Stenger *et al.*, 1994; Gomes *et al.*, 2003).

Dados na literatura mostraram que moléculas presentes na superfície da *Leishmania*, GP63 e LPG, desempenham papéis importantes no mecanismo de defesa do parasito em relação à resposta microbida dos macrófagos (Alexander *et al.*, 1999). Estudos em modelos experimentais por inoculação de cepas de *Leishmania (L.) major* mutantes que não expressavam as moléculas GP63 ou LPG mostraram redução na virulência da *Leishmania*, indicando importância destas moléculas no estabelecimento da infecção (Joshi *et al.*, 2002).

Outros estudos indicam que estas moléculas agem em conjunto para o sucesso no estabelecimento da vida intracelular do parasito. Durante a fase inicial da infecção intracelular, a molécula de LPG seria responsável por inibir a fusão do fagossomo, contendo o parasito, com os lisossomos contendo enzimas líticas, pelo fato de inibir a maturação do fagossomo (Dermine *et al.*, 2000; Desjardins *et al.*, 1997), enquanto que a GP63 ficaria responsável por inativar as enzimas do lisossomo, caso a fusão com o fagossomo ocorresse (Pessoa *et al.*, 1948).

Nossos resultados evidenciam que existe uma associação da produção da enzima cNOS com o mecanismo de escape do parasita com a célula hospedeira. Além de que a resposta microbida pelo macrófago depende da espécie de *Leishmania* envolvida e que o estabelecimento da infecção, sobrevivência do parasito no interior da célula hospedeira e a forma clínica resultante estão diretamente relacionadas com a capacidade do parasita em modular os mecanismos de defesa do macrófago.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados e discutidos permitem concluir que:

1. Todas as espécies estudadas expressam a enzima cNOS.
2. Todas as espécies estudadas apresentaram maior produção de óxido nítrico na fase logaritmica de crescimento quando comparada à fase estacionária de crescimento.
3. A espécie *L. braziliensis* apresentou uma forte reatividade na atividade diaforásica da enzima cNOS quando comparada com as espécies *L.shawi* e *L.amazonensis*.
4. Tanto *L. (L.) amazonensis* quanto *L. (V.) shawi* inibiram a produção de Óxido Nítrico por macrófagos ativados com LPS e INF – γ .

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. Biologia molecular da célula. **Ed. Artmed**, **4**: 1584. 2004.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **J Cell Sci**, **112**: 2993 – 3002. 1999.
- AMBROSIO, A. R. & DE MESSIAS-REASON, I. J. T. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*: Interaction of mannose-binding lectin with surface glycoconjugates and complement activation. An antibody-independent defence mechanism. **Parasite Immunol**, **27**: 333 – 340. 2005.
- ASSREUY, J.; CUNHA, F. Q.; EPPERLEIN, M.; NORONHA – DUTRA, A.; O'DONNELL, C. A.; LIEW, F. Y.; MONCADA, S. Production of Nitric Oxide and Superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. **Eur J Immunol**, **24**: 672 – 676. 1994.
- AYRES, M.; AYRES J.R., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. Bioestat 5.0, Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. **Sociedade Civil Mamirauá**, **4**: 2007.
- BAILEY, M. S. & LOCKWOOD, D. N.J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, **25**: 203–21. 2007.
- BALANCO J. M. F.; PRAL E. M. F.; DA SILVA S.; BIJOVSKY A. T. ; MORTARA R. A.; ALFIERI S. C. Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages. **Parasitology**, **116**: 103-113. 1998.
- BALESTIERI, F. M.; QUEIROZ, A. R.; SCAVONI, C.; COSTA, V. M.; BARRAL – NETTO, M.; ABRAHANSON, I. A. *Leishmania L. amazonensis* induced inhibition of Nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microb Infect.** **41**: 23 -29. 2002.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **Int J Parasitol**, **28**: 121 – 134. 1998.
- CAVALCANTI, D. P.; THIRY, M.; DE SOUZA, W. & MOTTA, M. C. M. The kinetoplast ultrastructural organization of endosymbiont-bearing trypanosomatids as revealed by deep-etching, cytochemical and immunocytochemical analysis. **Histochem Cell Biol**, **130**: 1177-1185. 2008.
- CUNNINGHAM, C. A. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. **Exp Mol Pathol**, **72**: 132 – 141. 2002.

- DERMINE JF, Scianimanico S, Prive C, Descoteaux A, Desjardins M. *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. **Cell Microbiol**, **2**: 115-126. 2000.
- DESCOTEAUX A.; DIALLO T. O. & LODGE R. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. **Cell Microbiol**, **8**: 1922–1931. 2006.
- DESJARDINS M, DESCOTEAUX A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. **J. Exp. Med**, **185**: 2061-2068. 1997.
- DUSSE, LUCI MARIA SANT'ANA.; VIEIRA, LAURO MELLO.; CARVALHO, MARIA DAS GRAÇAS. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab**, **39**: 2003.
- DUSTING, G.J. & MACDONALD, P.S. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. **Ann. Med**, **27**: 395-406, 1995.
- EVANS, T. G.; THAI, L.; GRANGER, D. L; HIBBS, J. B. Jr. Effect of In vivo Inhibition of nitric oxide production in murine Leishmaniasis. **J. Immun**, **151**: 907 – 915, 1993.
- FINALD.; JULIEN.; LAC.; GÉRARD.; FILAIRE.; EDITH SERENO. Oxidative Stress: Relationship with Exercise and Training. **Sports medicine**, **36**: 327-358.2006.
- FOTH B.; PIANI A.; CURTIS, J. M.; ILG, T. *Leishmania major* Proteophosphoglycans exist as Membrane-bound and Soluble Forms and Localize to the Cell Membrane, the flagellar pocket and the lysosome. **Int J Parasitol**, **32**: 1701 –1708. 2002.
- GANTT, K. R.; GOLDMAN, T.L.; MCCORMICK, M. L.; MILLER, M. A.; JERONIMO, S.M.B.; NASCIMENTO, E. T.; BRITIGAN, B.E.; WILSON, M.E. Oxidative Responses of Human and Murine Macrophages During Phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **J Immunol**, **167**: 893 – 901. 2001.
- GENESTRA M, ECHEVARRIA. A.; CYSNE-FINKELSTEIN L.; VIGNO´LIO-ALVES L, LEON L. L. Effect of amidine derivatives on nitric oxide production by *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. **Nitric Oxide Biol Chem**, **8**: 1–6. 2003a.
- GENESTRA M, SOUZA W. J.; CYSNE-FINKELSTEIN L.; GUEDES-SILVA D.; MACHADO G. M.; CYSNE-FINKELSTEIN L.; LEON L. L. Effect of l-Arginine Analogs and a Calcium Chelator on Nitric Oxide (NO´) Production by *Leishmania* sp. **J Enzyme Inhib Med Chem**, **18**: 445-452. 2003b.

- GENESTRA M, SOUZA W. J.; CYSNE-FINKELSTEIN L.; LEON L. L. Comparative analysis of nitric oxide production by *Leishmania* sp. **Med Microbiol Immunol**, **192**: 217-223. 2003c.
- GENESTRA M, SOUZA W. J.; DAMIANA GUEDES-SILVA.; WILSON J.S. SOUZA.; CYSNE-FINKELSTEIN L. Nitric oxide synthase (NOS) Characterization in *Leishmania amazonensis* Axenic amastigotes. **Arch Med Res**, **37**: 328-333. 2006a.
- GENESTRA M, SOUZA W. J.; GUEDES-SILVA D.; MACHADO G. M.; CYSNE-FINKELSTEIN L.; BEZERRA R. J.; MONTEIRO F.; LEON L. L. Nitric oxide biosynthesis by *Leishmania amazonensis* promastigotes containing a high percentage of metacyclic forms. **Arch Microbiol**, **185**: 348-354. 2006b.
- GOMES, I. N.; CALABRICH, A. F. C.; TAVARES, R. S.; WIETZERBIN, J.; FREITAS, L. A. R. F. & VERAS, P. S. T. Differential Properties of CBA/J Mononuclear Phagocytes Recovered From an Inflammatory Site e Probed With Two Different Species of *Leishmania*. **Microb Infect**, **5**: 251-260. 2003.
- GREGORY D. J.; OLIVIER M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. **Parasitol**, **130**: 27–35. 2005.
- GROVES J.T.; WANG, C. Nitric Oxide Synthase: models and mechanisms. **Curr Opin Chem Biol**, **4**: 687 – 695. 2000.
- GRUENHEID, S. & FINLAY, B. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. **Nature**, **422**. 2003.
- GUEIRARD, P.; LAPLANTE, A.; RONDEAU, C.; MILON, G.; DESJARDINS, M. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. **Cell Microbiol**, 2007.
- HANDMAN, E.; BULLEN, V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitol**, **18**: 332 – 334. 2002.
- HORTELANO, S.; TRAVÉS, P.G.; ZEINI, M.; ALVAREZ, A. M.; BOSCA, L. Sustained Nitric Oxide Delivery Delays Nitric Oxide-Dependent Apoptosis in Macrophages: Contribution to the Physiological Function of Activated Macrophages. **J Immunol**, **171**: 6059–6064, 2003.
- HANDMAN, E.; BULLEN, V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitol**, **18**: 332 – 334. 2002.

- Ilg T, DEMAR M, Harbecke D. Phosphoglycan repeat-deficient *Leishmania mexicana* parasites remain infectious to macrophages and mice. **J Biol Chem**, **276**: 4988-4997. 2001.
- JOSHI, P. B.; KELLY, B. L.KAMHAWI, S.; SACKS,D. L.; MCMASTER,W. R. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. **Mol Biochem Parasitol**, **120**: 33–40, 2002.
- KIMA, P. E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **Int J Parasitol**, **37**: 1087–1096. 2007.
- LAINSON, R. *Leishmania* e Leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. **Rev. Paraense Med**, **11**: 29 – 38. 1997.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: W. Peters, R. Killick – Kendrick, Eds., “The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Biology and Epidemiology” **Acad Press Inc**, **1**: 1-120. 1987.
- LIBUSOVÁ, L.; SULIMENKO, T.; SULIMENKO, V.; HOZÁK, P.; DRÁBER, P. Gamma-Tubulin in *Leishmania*: cell cycle-dependent changes in subcellular localization and heterogeneity of its isoforms. **Exp Cell Res**, **295**: 375–386. 2004.
- LO, A.; LIANG, Y.; LIN-SHIAU, S.; HO, C.; LIN, J. Carnosol, na antioxidant in rosemary, supresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-kB in mouse macrophages. **Carcinogenesis**, **23**: 983-991. 2002.
- MCCONVILLE, M. J. & HANDMAN, E. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. **Int J Parasitol**, **37**: 1047–1051.2007
- MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J.Biol.Chem**, **17**. 1993.
- MAUEL, J. & RANSIJN, A. *Leishmania* sp.: Mechanisms of toxicity of Nitrogen Oxidation product. **Exp Parasitol**, **87**: 98 – 111. 1997.
- MOSSALAYI, M. D.; MAZIER, A.D.; VINCENDEAU, P.; VOULDOUKIS, I. The Human Immune Response during Cutaneous Leishmaniasis: NO Problem. **Parasitol Today**, **15**: 342 – 345. 1999.
- MURREY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. Elements of host protective response. In: **Medical Microbiol**, **3**: 80. 1998.
- NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M. & VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 52. 2005.

- PAVETO, C.; PEREIRA, C.; ESPINOSA, J.; MONTAGNA, A.E., FARBER, M., ESTEVA, M., FLAWIA, M.M., TORRES, H.N. The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**, **270**: 1–4.1995.
- PESSOA, S.B., BARRETO, M.P. Leishmaniose tegumentar Americana. In: Ministério da Educação e Saúde. **Imprensa Nacional**, 527.1948.
- PIACENZA L, PELUFFO G, RADI R. L-Arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. **PNAS** **98**, **13**: 7301–7306. 2001.
- PRASAD, A.; KAUR, S.; MALLA, N.; GANGULY, N. K.; MAHAJAN, R. C. Ca^{2+} signaling in the transformation of promastigotes to axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. **Mol Cell Biochem**, **224**: 39-44. 2001.
- PROUDFOOT, L.; DONNLL, C.A. O.;F.Y. Liew, Glycoinositolphospholipids of *Leishmania* major inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages, **Eur. J. Immunol**, **25**: 745–750. 1995.
- PROUDFOOT, L; NIKOLAEV, A.V.; FENG, G.J., WEI, X.Q., FERGUSON, M.A.J., BRIMACOMBE, J.S; LIEW, F.Y. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. **PNAS**, **93**:10984–10989. 1996.
- REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER. S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**; **7**: 581–96, 2007.
- RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania* – Host – Cell Interaction: Complexities an Alternative Views. **Parasitol Today**, **16**: 292 – 297. 2000.
- ROBINSON, J. M.; OHIRA T. & BADWEY J. A. Regulation of the NADPH-oxidase complex of phagocytic leukocytes. Recent insights from structural biology, molecular genetics, and microscopy. **Histochem. Cell Biol**, **122**: 293–304. 2004.
- SACKS, D. L. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cell Microbiol**, **3**: 189 -196. 2001.
- SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania* major in mice. **Nature Reviews Immunology**, **2**: 845-858. 2002.
- SEABRA, S. H.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R. *Toxoplasma gondii* Partially Inhibits Nitric Oxide Production of Activated Murine Macrophages. **Exp Parasitol**, **100**: 62 – 70. 2002.

- SERENO, D.; CORDEIRO DA SILVA, A.; MATHIEU-DAUDE, F.; OUAISSI, A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. **Parasit Intern**, **56**: 3–7. 2007.
- SILVEIRA, F. T.; ISHIKAWA E.A.Y.; DE SOUZA A.A.A., LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania* (*Viannia*) *lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite**, **9**: 43-50. 2002.
- SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CARLOS E. P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **99**: 239-251. 2004.
- STAFFORD L. J.; NEUMANN, N. F. & BELOSEVIC, M. Macrophage – mediated innate Host Defense against Protozoan Parasites. **Crit Rev Microbiol**, **28**: 187–248. 2002.
- STENGER, S.; RING, H., RÖLLINGHOFF, M. & BOGDAN, C. Tissue Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase Is Closely Associated with Resistance to *Leishmania major*. **J Exp Med**, **180**: 783 – 793. 1994.
- TANAKA, A. K.; GORIN, P. A. J.; STRAUS, A. H. Role of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Amastigote Glycosphingolipids in Macrophage Infectivity. **Braz J Med Biol Res**, **40**: 799-806. 2007.
- TEMPORAL, R.M.; CYSNE-FINKELSTEIN, L; ECHEVARRIA, A.; LEON, L.L; GENESTRA, M. Amidine derivatives and *Leishmania amazonensis*: evaluation of the effect in the nitric oxide (NO) production on the parasite-macrophage interaction. **J Enz Inhib Med Chem**, **20**:13–18. 2005.
- TRACEY, W.R; NAKANE, M.; POLLOCK, J. S.; FORSTERMANN, U. Nitric oxide synthases in neuronal cells, macrophages and endothelium are NADPH diaphorases, but represent only a fraction of total cellular NADPH diaphorase activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, **195**: 1035-1040. 1993.
- VAN ZANDBERGEN, G; BOLLINGER A.; WENZEL A.; KAMHAWI S.; VOLL R.; KLINGER M.; MULLER A.; HOLSCHER C.; HERRMANN M.; SACKS D.; SOLBACH W.; LASKAY T. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **PNAS**, **103**: 13837-13842. 2006.
- VANNIER – SANTOS, M. A.; MARTINY, A. & DE SOUZA, W. Cell Biology of *Leishmania* spp.: Invading and Evading. **Curr Pharmac Design**, **4**: 297 – 318. 2002.

- VIEIRA, M. L.; JACOBINA R. R.; SOARES, N. M. Casos de leishmanioses em pacientes atendidos nos centros de saúde e hospitais de Jacobina-ba no período de 2000 a 2004. **Revista Baiana de Saúde Pública**, **31**: 100-233. 2007.
- WANDERLEY, J. L. M.; MOREIRA, M. E. C.; BENJAMIN, A.; BONOMO, A. C.; BARCINSKI, M. A. Mimicry of Apoptotic Cells by Exposing Phosphatidylserine Participates in the Establishment of Amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in Mammalian Hosts. **The J of Immunology**, **176**: 1834–1839, 2006.
- WHO. The Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Leishmaniasis: Disease information. Disponível em <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>. Último acesso em: 15/11/2009.
- WINBERG, M. E.; RASMUSSEN, B.; SUNDQVIST, T. *Leishmania donovani*: Inhibition of phagosomal maturation is rescued by nitric oxide in macrophages. **Exp Parasitol**, **117**: 165–170. 2007.

8 ANEXOS



SMC

Simpósio de Microscopia no Cerrado



Certificado

Certifico que TRINDADE, E. L.; RODRIGUES, A. P. D.; RAMOS, P. K. S.; SILVA, E. O. apresentaram o pôster intitulado "COMPARATIVE ANALYSIS OF THE ENZYME CONSTITUTIVE NITRIC OXIDE SYNTHASE (cNOS) EXPRESSION IN THE Leishmania (L.) amazonensis AND Leishmania (V) shawi" durante o Simpósio de Microscopia no Cerrado realizado entre os dias 24 e 26 de setembro de 2008 no Centro de Convenções da Pousada Pirineus.

Pirenópolis, 26 de setembro de 2008

Sônia Nair Báb
Presidente do Comitê Organizador do SMC
Instituto de Ciências Biológicas - UNB



XIII International Congress of Protistology
XXV Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology
XXXVI Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease
Armação dos Búzios, RJ 23-28 August, 2009

CERTIFICATE

We hereby certify that the abstract entitled *Comparative analysis of the enzyme constitutive active oxide synthase (NAD) in different species of Leishmania caused of cutaneous leishmaniasis*.....
by authors: *Grindade, E. L. J.; Rodrigues, A. P. D.; Farias, A. H. S.; Silva, R. P. P.; Silva, E. D.*.....

.....
was presented during the XIII International Congress of Protistology / XXV Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology / XXXVI Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease in Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, Brazil, from August 23 to 28, 2009.

Lucia Mendonça Prevato

Lucia Mendonça Prevato
President SBPz

Wanderley de Souza

Wanderley de Souza
President ICOP