



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

AMANDA ANASTÁCIA PINTO HAGE

**ANÁLISE CITOQUÍMICA E ULTRAESTRUTURAL DE DUAS CEPAS
DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* OBTIDAS EM
DIFERENTES DIAS DE CULTIVO *IN VITRO***

BELÉM - PA

2009

AMANDA ANASTÁCIA PINTO HAGE

**ANÁLISE CITOQUÍMICA E ULTRAESTRUTURAL DE DUAS CEPAS
DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* OBTIDAS EM
DIFERENTES DIAS DE CULTIVO *IN VITRO***

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

AMANDA ANASTÁCIA PINTO HAGE

**ANÁLISE CITOQUÍMICA E ULTRAESTRUTURAL DE DUAS CEPAS
DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* OBTIDAS EM
DIFERENTES DIAS DE CULTIVO *IN VITRO***

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.

Profª Drª Edilene Oliveira da Silva
Orientadora
(ICB – UFPA)

Profª Drª. Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira
(ICB – UFPA)

Profª Drª. Sanny Helena Valente de Oliveira Albério
(CCBS – UEPA)

Belém (PA), 16 de Dezembro de 2009.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

Aos meus pais pelo apoio, incentivo e confiança...

Aos meus irmãos pelo carinho e atenção.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço à Deus por ter me concedido sabedoria, discernimento, compreensão e forças para não desanimar.

À minha mãe, Maria Nely, exemplo de mulher e mãe, pelo amor, carinho, dedicação e perseverança, por acreditar em meus ideais e me incentivar a torná-los reais. Ao meu pai, Armando Hage Jr., por proporcionar minha educação, tanto escolar quanto moral, me ensinando a nunca duvidar de minha capacidade.

Aos meus seis irmãos, que embora algumas vezes distantes sempre estiveram comigo, torcendo pelo meu sucesso e assim continuará, em especial ao Armando Hage Filho, por fazer parte da minha criação, sendo muita das vezes mais que um irmão, um pai. Agradeço pelo seu carinho, atenção, puxões de orelha, pelos vários diálogos produtivos e, por várias vezes, pelo apoio financeiro.

À Prof^a. Dr^a. Edilene, pela oportunidade de estagiar no Laboratório de Parasitologia, pela orientação, incentivo à pesquisa e ao aprendizado dado durante os anos de iniciação científica e durante a realização deste trabalho.

À todos do Laboratório de Parasitologia, pelo companheirismo e momentos de descontração. Em especial à Ana Paula Drummond e Luis Henrique, por seus ensinamentos e conselhos, e à Raquel Raick, pelo auxílio e apoio durante muitos experimentos.

À Eliane Trindade, parceira e amiga para todas as horas, na graduação, no Laboratório, no percurso para casa, nos estágios rotatórios e supervisionados, enfim, agradeço pela companhia, amizade, por ter escutado todas as minhas angústias, desabafos e pelo apoio nos momentos de tristeza e felicidade.

Às amigas de graduação Sara Lobato e Fernanda Loureiro, que juntas formávamos um ótimo quarteto e hoje vencemos nossos objetivos, agradeço por todas as gargalhadas, caronas, trabalhos, conversas e pelas palavras de ânimo.

A todos, que de alguma maneira apoiaram e contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELA.....	vi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	ix
 1 INTRODUÇÃO	 1
1.1 AS LEISHMANIOSES	1
1.1.1 Classificação	3
1.1.2 Morfologia	4
1.1.3 Ciclo Biológico.....	5
1.1.4 Relação Parasito-Hospedeiro.....	6
1.2 ORGANELAS E ESTRUTURAS CITOPLASMÁTICAS ESPECIAIS.....	9
1.2.1 Organelas envolvidas em vias endocíticas	9
1.2.2 Organelas envolvidas em vias metabólicas	11
 2 JUSTIFICATIVA.....	 13
 3 OBJETIVOS	 14
3.1 OBJETIVO GERAL.....	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
 4 MATERIAL E MÉTODOS.....	 15
4.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DO PARASITO	15
4.2 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	15
4.3 ANÁLISE CITOQUÍMICA POR MET	16
4.3.1 Detecção de lipídios pela técnica ósmio-imidazol.....	16
4.3.2 Detecção de sítios de cálcio pela técnica de piroantimoniato de potássio.....	16
 5 RESULTADOS.....	 17
5.1 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL POR MET	17
5.2 ANÁLISE CITOQUÍMICA POR MET	19

5.2.1 Detecção de lipídios pela técnica ósmio-imidazol.....	19
5.2.2 Detecção de sítios de cálcio pela técnica do piroantimoniato de potássio	21
5.3 ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS	23
6 DISCUSSÃO	25
7 CONCLUSÕES.....	29
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
9 ANEXO.....	36

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1 – Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i>	03
Figura 2 – As diferentes formas evolutivas do protozoário do gênero <i>Leishmania</i>	04
Figura 3 – Ciclo de vida do parasita do gênero <i>Leishmania</i>	06
Figura 4 – Desenho esquemático da ação da enzima iNOS.....	08
Figura 5 – Principais estruturas e organelas citoplasmáticas de promastigota do gênero <i>Leishmania</i> em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET).....	12
Figura 6 – Promastigotas de duas cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i> em diferentes dias de cultivo <i>in vitro</i> por MET.....	18
Figura 7 – Identificação citoquímica ultraestrutural pelo método ósmio-imidazol de promastigotas de duas cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i> em diferentes dias de cultivo <i>in vitro</i>	20
Figura 8 – Identificação citoquímica ultraestrutural pela técnica de piroantimoniato de potássio de promastigotas de duas cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i> em diferentes dias de cultivo <i>in vitro</i>	22
Figura 9 – Controle da técnica de piroantimoniato de potássio em promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> , utilizando solução de EGTA 5 mM.....	23
Tabela 1 – Diferença na distribuição de componentes citoplasmáticos identificados nas cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i> nos diferentes dias de cultivo.....	24

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ATP – Adenosina Trifosfato

DNA – Sigla inglesa para ácido desoxirribonucleico

EGTA – Sigla inglesa para ácido etileno-glicol tetra acético

EST – Estacionária

GP63 – Glicoproteína 63

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IL – Interleucina

INF- γ – Interferon - γ

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

LCL – Leishmaniose cutânea localizada

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LOG – Logarítmica

LPG – Lipofosfoglicano

LPS – Lipopolissacarídeo

LTA – Leishmaniose tegumentar americana

M – Molar

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

NNN – Neal, Novy e Nicolle

NO – Óxido nítrico

O²⁻ – Íon superóxido

OH⁻ – Radical hidroxila

ROS – Radicais de oxigênio

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

SBF – Soro bovino fetal

SFM – Sistema Fagocítico Mononuclear

TNF- α – Sigla inglesa para fator de necrose tumoral

RESUMO

A Leishmaniose tegumentar americana (LTA) constitui uma protozoose com elevada incidência na região Amazônica e um sério problema de saúde pública. Uma variedade de espécies de *Leishmania* é responsável por esta patologia. Desta forma, dependendo da espécie e da resposta imunológica do hospedeiro vertebrado, a doença pode se apresentar com uma variedade de manifestações clínicas, incluindo a leishmaniose cutânea e mucocutânea. A principal espécie responsável pela LTA é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Contudo, devido à existência de uma multiplicidade de cepas desta espécie, torna-se importante o conhecimento dos aspectos básicos do protozoário, como suas características ultraestruturais, na tentativa de caracterizar componentes fundamentais para seu desenvolvimento e metabolismo, e identificar possíveis alvos para ação de drogas terapêuticas. Este trabalho tem como objetivo a caracterização ultraestrutural e análise citoquímica, comparativa entre duas cepas de *L. (V.) braziliensis* isolada de diferentes casos clínicos e em diferentes fases do crescimento celular. As formas promastigotas das cepas M17593 (cutânea) e M17323 (mucocutânea) de *L. (V.) braziliensis* foram mantidas em meio RPMI 1640 à 27°C e utilizadas na fase logarítmica (FL) e estacionária (FE). As células foram fixadas em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído tipo II, 4% de paraformaldeído e 2,5% de sacarose, em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7,2. Após lavagem, foram incubadas em solução contendo tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8% por uma hora, desidratadas em acetona, infiltradas e incluídas em resina Epon. Os cortes obtidos por ultramicrotomia foram contrastados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo, e analisados em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) LEO 906. Para caracterização e análise citoquímica ultraestrutural, os parasitos foram processados de acordo com o método ósmio-imidazol e a técnica de piroantimoniato de potássio, para detecção de lipídios e de sítios de cálcio, respectivamente. A análise por MET, confirmada por métodos citoquímicos, mostrou a presença de inclusões lipídicas, acidocalcissomos e íons Ca^{2+} distribuídos no citoplasma das duas cepas do parasito. A cepa M17593 (cutânea) apresentou maior distribuição de inclusões lipídicas na FL, ao passo que a cepa M17323 (mucocutânea) na FE. Ambas as cepas apresentaram maior distribuição da organela acidocalcissomo no citoplasma durante a FL, e presença marcante de íons Ca^{2+} na membrana do parasito na FE. A presença, em grande quantidade, de inclusões lipídicas e acidocalcissomos nas promastigotas da cepa cutânea na FL pode está relacionada com o elevado metabolismo energético do parasito, já que necessitam de lipídios e íons Ca^{2+} para seu desenvolvimento. A maior distribuição de inclusões lipídicas no citoplasma e íons Ca^{2+} na membrana na FE da cepa M17323 (mucocutânea) pode estar relacionado com a forma mais agressiva da doença, sendo estes componentes fundamentais para o processo de interação parasito-célula hospedeira.

Palavras-chave: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, citoquímica, ultraestrutura.

1. INTRODUÇÃO

1.1. AS LEISHMANIOSES

As leishmanioses constituem um grupo de doenças clinicamente heterogêneas, causadas pela infecção por protozoários do gênero *Leishmania* (Neuber, 2008). Vinte espécies deste parasito são patogênicas ao homem, e são transmitidas através da picada de insetos vetores hematófagos denominados de flebotomíneos, os quais pertencem a trinta espécies diferentes (Desjeux, 2004; WHO, 2009). Dependendo da espécie, estas patologias podem se apresentar sob três formas clínicas principais: cutânea, mucocutânea e visceral, que abrange uma ampla variedade de sinais, sintomas e graus de severidade (González *et al.*, 2009).

Esta parasitose é um sério problema de saúde pública com aproximadamente 350 milhões de pessoas residentes em áreas endêmicas sob risco de infecção e 2.357.000 novos casos por ano, sendo incidente em muitos países, sobretudo nas Américas, na Ásia e na África. Na América Latina, o Brasil é o país que registra o maior número de casos, cerca de 90% do total notificado (WHO, 2009).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é umas das manifestações mais frequentes de infecção e representa 75 % de todos os casos registrados. O Programa Nacional de Vigilância em Saúde do Brasil tem indicado que a prevalência de LTA no país abrange 11,9 a 22,9 casos por 100.000 habitantes entre 1990 e 2006 (Gomes-Silva *et al.*, 2008). Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, somente no ano de 2006 foram notificados 25.782 casos de LTA, dos quais 14.900 foram registrados nos estados que fazem parte da Amazônia brasileira, mantendo-se valores semelhantes em anos anteriores. Denotando assim, característica de doença endêmica nacional (Silva & Muniz, 2009).

No Brasil, as três principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela LTA são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; mais recentemente, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi* e *Leishmania (Viannia) shawi* foram identificadas como novos agentes da doença (Brasil, 2006). Segundo Gomes-Silva *et al.* (2007), o principal agente etiológico da LTA é o parasito da espécie *L. (V.) braziliensis*. Dependendo da espécie, e da resposta imune celular da pessoa infectada, a doença pode manifestar um espectro de formas clínicas da

doença, dentre elas a leishmaniose cutânea localizada e a leishmaniose mucocutânea (Silveira *et al.*, 2004).

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a forma mais freqüente da doença, caracterizada pela presença de úlceras múltiplas ou únicas na pele, com bordas infiltradas e eritematosas, de fundo granuloso, localizadas principalmente nas áreas expostas do corpo (Silveira *et al.*, 2004; Nogueira *et al.*, 2008). A lesão provocada pela espécie *L. (V.) braziliensis* apresenta uma infiltração modesta na lesão com escassos macrófagos e parasitos (Morgado *et al.*, 2008). Imunologicamente a LCL se caracteriza principalmente pela resposta imune através das células T CD4⁺ e CD8⁺ tanto em pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* quanto naqueles com *L. (L.) amazonensis*, porém a resposta imune provocada pela primeira espécie apresenta maior expressão de INF- γ e baixa ou nenhuma expressão de IL-4 nas lesões dos pacientes infectados (Silveira *et al.*, 2004).

A leishmaniose mucocutânea (LMC) desenvolve-se a partir de uma complicação da LCL, na qual protozoários são disseminados pelo sistema linfático e parasitam o trato mucoso. É caracterizada por lesões ulceradas e infiltradas na mucosa oral, nasal, faríngea e laríngea, com comprometimento em torno da mucosa nasal (Nogueira *et al.*, 2008; Sakthianandeswaren *et al.*, 2009;). Está associada com a exacerbada resposta imune celular, sendo novamente a reação imune causada pela espécie *L. (V.) braziliensis* maior quando comparada com outras espécies do mesmo subgênero (Silveira *et al.*, 2004). Seu aspecto imunológico tem como característica a presença predominante de células T CD4⁺ nas lesões em detrimento das células T CD8⁺ (Esterre *et al.*, 1994). De forma similar ao que acontece na LCL, os níveis de INF- γ e TNF- α nas lesões são bem elevados enquanto que os níveis de IL-4 e IL-10 permanecem baixos, o que contribui para a exacerbação da resposta imune inflamatória do hospedeiro (Gomes-Silva *et al.*, 2007).

Estudos de Campos *et al.* (2008) confirmam a variação da infectividade *in vitro* entre cepas da espécie *L. (V.) braziliensis* de pacientes com diferentes formas clínicas de LTA. Cepas de *L. (V.) braziliensis* de pacientes com LCL apresentam baixo grau de infectividade quando comparado às cepas isoladas de paciente com LMC, forma mais severa da LTA. Esta variação na espécie pode está diretamente relacionada à forma clínica da doença causada por este parasito.

1.1.1. Classificação

Desde a descrição original destes parasitos e da criação do gênero *Leishmania* por Ross em 1903, o número de espécies reconhecidas aumentou continuamente, e vários esquemas de classificação taxonômica foram propostos (Grimaldi Jr. & Tesh, 1993). As classificações mais utilizadas na atualidade seguem o modelo taxonômico proposto por Lainson & Shaw em 1987, que dividem as *Leishmanias* nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (Figura 01). No Brasil são reconhecidas pelo menos sete espécies de *Leishmanias* responsáveis por doença humana, sendo a forma tegumentar causada principalmente pela *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais raramente, pela *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*, enquanto a *Leishmania (Leishmania) chagasi* é a responsável pela doença visceral. Cada espécie apresenta particularidades concernentes as manifestações clínicas, a vetores, reservatórios e padrões epidemiológicos, a distribuição geográfica e até mesmo a resposta terapêutica (Vale & Furtado, 2005; Brasil, 2007).

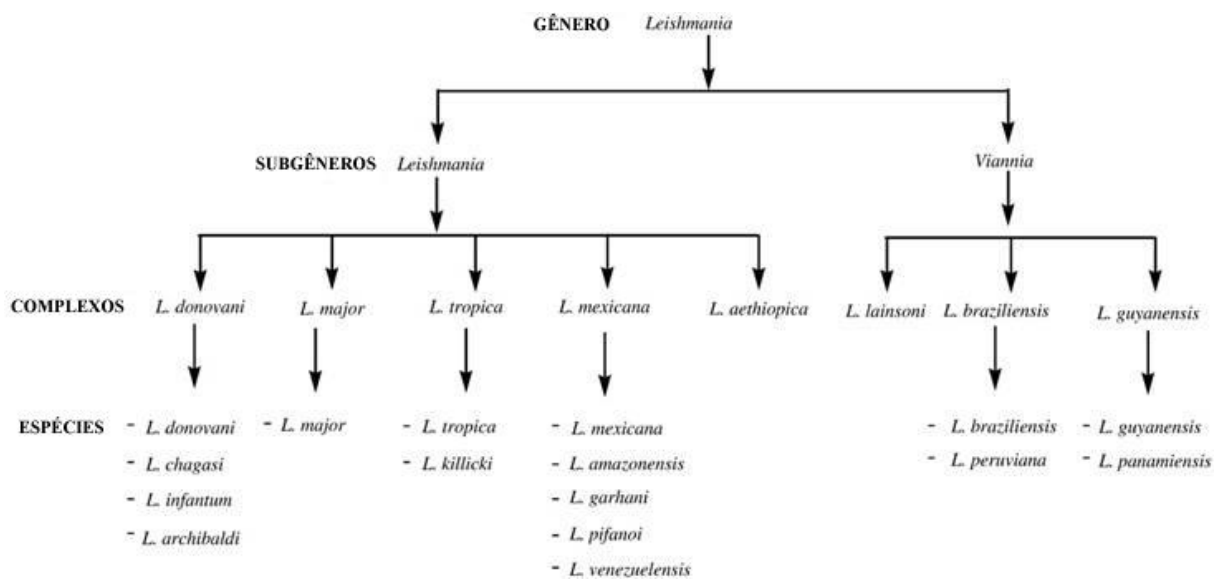


Figura 01: Taxonomia do gênero *Leishmania*. Fonte: Mishra *et al.*, 2009 (modificada).

1.1.2. Morfologia

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos digenéticos (heteroxenos), apresentando as formas promastigosta e amastigota (Tanaka *et al.*, 2007).

As formas promastigotas são de vida extracelular e possuem um corpo celular fusiforme e alongado. Apresentam um longo flagelo livre emergindo a partir da bolsa flagelar, uma pequena invaginação na região anterior do parasito, e são encontradas no tubo digestivo do flebotomíneo (Figura 02-A). As formas amastigotas são intracelulares obrigatórias, com corpo celular pequeno, esférico ou ovóide, e sem motilidade. O pequeno flagelo presente é internalizado e mantido na bolsa flagelar, possível de visualizar em microscópio eletrônico de transmissão (MET). São encontradas no interior de vacúolos das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), principalmente em macrófagos do hospedeiro mamífero (Figura 02-B). Além disso, em ambas as formas há presença de uma mitocôndria que se estende ao longo do corpo celular e que em determinada porção, próximo ao corpo basal, possui um arranjo complexo de DNA mitocondrial, denominado cinetoplasto, característico de sua classe *Kinetoplastida*. Sua localização é perpendicular à base do flagelo, e as relativas posições destas duas estruturas é o principal modo de classificação dos diferentes estágios de ciclo de vida de tripanossomatídeos (Souza *et al.*, 1997; Vannier – Santos *et al.*, 2002; Cavalcanti *et al.*, 2008).

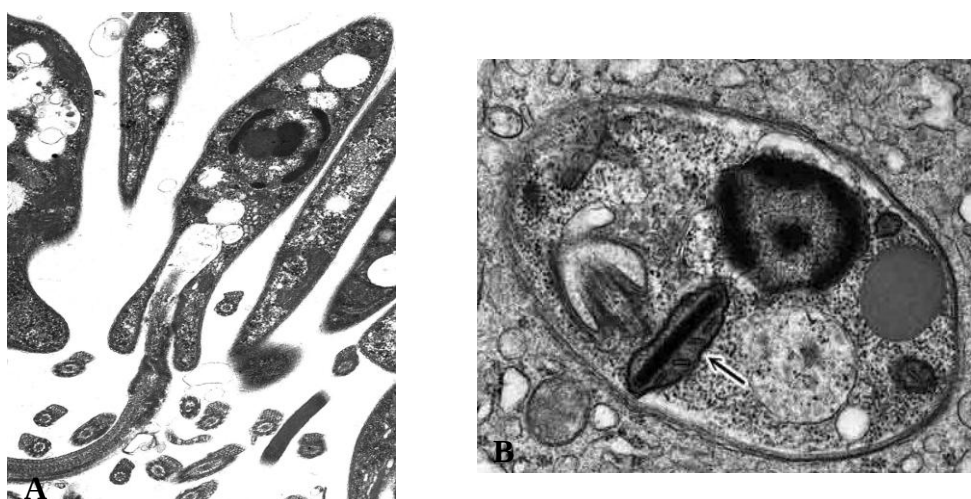


Figura 02: As diferentes formas evolutivas do protozoário do gênero *Leishmania*. (A) Forma promastigota de *L. (V.) braziliensis* em MET. Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural, ICB/UFPA, 2007. (B) Forma amastigota de *Leishmania* spp. em MET. Fonte: Ju *et al.*, 2004 (modificada).

1.1.3. Ciclo Biológico

Os ciclos de transmissão da LTA variam de acordo com a região geográfica, espécie de parasito, vetores, reservatórios e hospedeiros. Os vetores da LTA são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à Ordem Diptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, Gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (Brasil, 2007).

O ciclo de vida destes parasitos no interior do hospedeiro invertebrado segue as seguintes características comuns (Figura 03). Formas amastigotas do protozoário são ingeridas pelo flebotomíneo fêmea ao realizar o repasto sanguíneo de um hospedeiro mamífero infectado. Neste hospedeiro, as amastigotas encontram-se livres na circulação ou no interior de macrófagos. O sangue ingerido contendo os parasitos vai para o intestino médio do inseto, onde amastigotas transformam-se em promastigotas procíclicas. Após, aproximadamente, cinco dias, no intestino médio anterior do flebotomíneo os parasitos se desenvolvem em promastigotas metacíclicas, em um processo de diferenciação celular designado metaciclogênese tornando-se infectantes para o hospedeiro vertebrado (Chang & Chaudhuri, 1990; Grimaldi & Tesh, 1993; Bates, 2006; Neuber, 2008).

As promastigotas metacíclicas migram para a probóscida do vetor e durante o hematofagismo, são inoculadas no hospedeiro (Bates, 1994). Estas formas resistem à ação lítica do complemento e então, são rapidamente fagocitadas por células do SFM, neutrófilos e monócitos, atraídos para o lugar da inoculação pela reação inflamatória (Rasmusson & Descoteaux, 2004; Gueirard *et al.*, 2008; Neuber, 2008). Em seguida, há diferenciação para a forma de resistência, as amastigotas, aptas para se multiplicarem no interior do vacúolo parasitóforo, compartimento com pH ácido e enzimas hidrolíticas (Henriques *et al.*, 2003). As amastigotas se multiplicam no interior das células fagocíticas até sua ruptura, ficando livres na circulação e infectando novas células vizinhas e 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 & Lockwood, 2007; Sakthianandeswaren *et al.*, 2009).

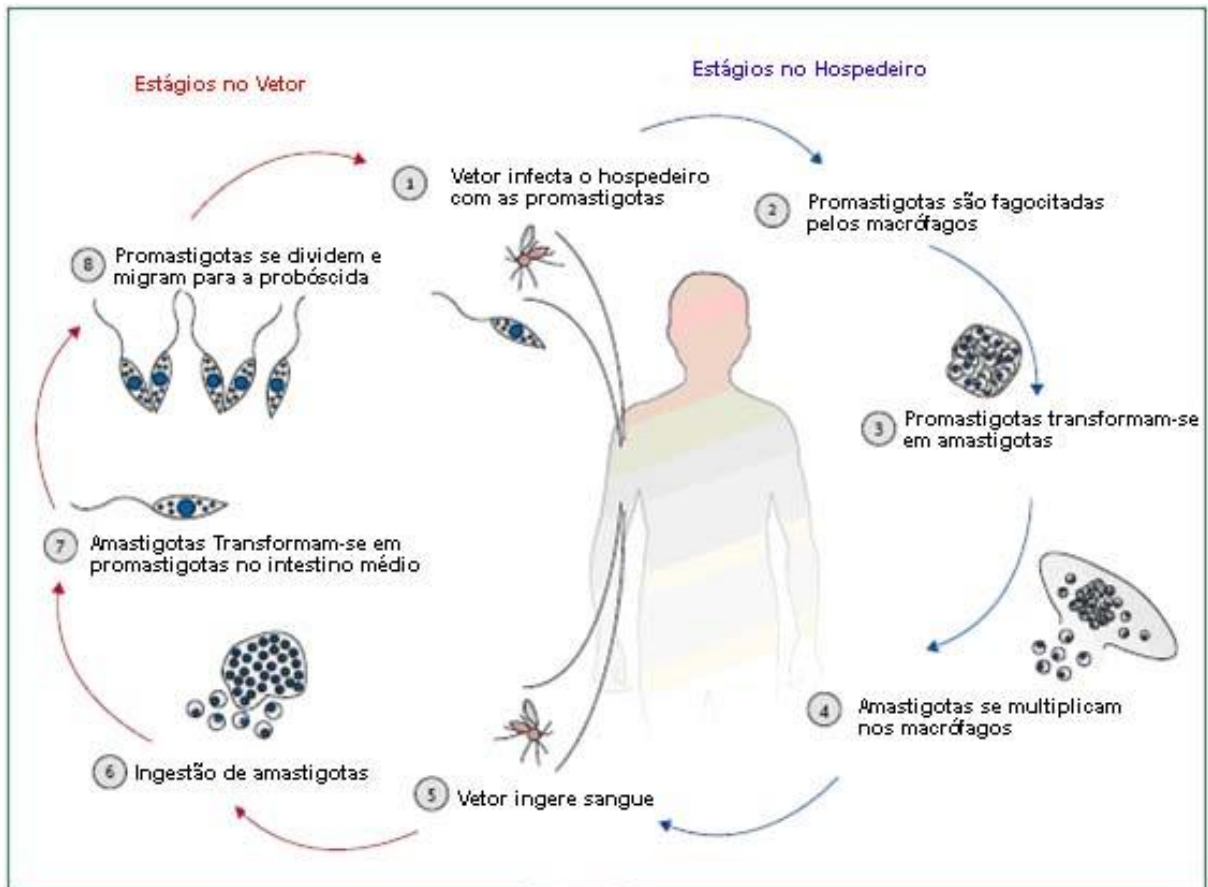


Figura 03: Ciclo de vida do parasita do gênero *Leishmania*. Fonte: Reinthinger *et al.*, 2007 (modificada).

1.1.4. Relação Parasito-Hospedeiro

As *Leishmanias* são parasitos intracelulares obrigatórios, cujos macrófagos são as principais células hospedeiras do SFM em mamíferos infectados (Handman & Bullen, 2002; McConville *et al.*, 2007).

Originadas a partir de monócitos, os macrófagos desempenham importante função na defesa inata do organismo, se comportando como células primárias que reconhecem, fagocitam e destroem patógenos invasores e células mortas. Para a destruição de patógenos, estas células produzem uma série de produtos citotóxicos incluindo espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânions superóxidos (O_2^-), radicais hidroxila ($OH^\cdot$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em um fenômeno denominado “burst oxidativo”, além de óxido nítrico (NO), produzido através da ativação da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), e outros produtos altamente tóxicos para organismos invasores. Também produzem citocinas

que regulam sua atividade, assim como o recrutamento e ativação de outras células inflamatórias. A imunidade celular depende da diferenciação de células T-helper 0 (Th0) para T-helper 1 (Th1), e também é regulada pela ação de macrófago. Interleucina-12 (IL-12) e Interferon- γ (INF- γ) são citocinas pró-inflamatórias secretadas por macrófagos ativados e desenvolvem importante função na diferenciação das células Th *naive* para pró-inflamatórias Th1 subsequentes. Porém, parasitas intracelulares, como a *Leishmania*, são capazes de evadir desta resposta microbicida, sobreviver e se proliferar dentro dos macrófagos (Robinson *et al.*, 2004; Maity *et al.*, 2009).

O reconhecimento inicial do parasito pela célula do hospedeiro vertebrado se dá por meio de receptores presentes na membrana do macrófago e ligantes específicos de promastigota de *Leishmania*, principalmente, glicoproteína de 63 Kda (GP63) e lipofosfoglicano (LPG), presentes na membrana do parasito. Uma série de estudos identificou receptores de macrófagos envolvidos no processo de invasão do protozoário, incluindo receptores manose-fucose, receptores dos produtos finais da glicosilação, receptores do complemento (CR1 e CR3), receptores Fc e receptores de fosfatidilserina (Mauël, 1990; Tripathi & Gupta, 2003; Tanaka *et al.*, 2007).

Após adesão à superfície celular dos macrófagos, as formas promastigotas são fagocitadas formando um fagossomo e, posteriormente, quando há fusão lisossomal, um fagolisossomo, dando origem ao vacúolo parasitóforo. Durante este processo a forma do parasito é alterada, e algumas das moléculas envolvidas na adesão ao macrófago e no mecanismo de evasão em formas promastigotas, também estarão presentes na forma amastigota. Esta forma resiste e se multiplica na célula hospedeira por mecanismos ainda pouco conhecidos e, rapidamente, reinfecta outros fagócitos, como macrófagos e células dendríticas e alguns tipos celulares não fagocíticos, como os fibroblastos (Cunningham *et al.*, 2002; McConville *et al.*, 2007).

A GP63 é uma metaloprotease abundante na superfície de promastigotas (Handman & Bullen, 2002; Rodríguez, 2003). Atua como importante fator de virulência durante a interação com a célula hospedeira e também, com o sistema do complemento, diretamente sobre a proteína C3, inibindo a cascata imunológica (Joshi *et al.*, 2002). Em formas amastigotas, a GP63 confere capacidade em degradar enzimas lisossomais por apresentar ótima atividade em meio ácido, presente nos fagolisossomos (Cunningham *et al.*, 2002). Também pode ajudar parasitos presentes no vacúolo parasitóforo na obtenção de nutrientes, fator essencial para seu desenvolvimento (Mauël, 1990). Estudos de Winberg *et al.* (2007), mostraram que a GP63 também é capaz de inativar a iNOS em macrófagos infectados

com *Leishmania (Leishmania) major*.

A enzima iNOS ativada em resposta a sinais extracelulares, como INF- γ e LPS, é responsável pela produção de NO em macrófagos, a partir da conversão da arginina em NO e L-citrulina (Figura 04). Carboidratos presentes na superfície de membrana de amastigotas, como os presentes na composição estrutural da GP63, inibem a produção de NO, reduzindo sua atividade leishmanicida (Cunningham *et al.*, 2002).

Infecções pelo parasito *Leishmania* podem prejudicar a atividade microbicida de macrófagos, impedindo a liberação de ROS. A expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e INF- γ , que estão envolvidas na resposta de Th1 e na imunidade mediada por células, também é reduzido pela infecção. Além disso, o protozoário induz no macrófago a produção de moléculas imunossupressoras, como IL-10, uma citocina de classe Th2, que previne a ativação de células T, proliferação e função efetoras de macrófagos, incluindo a liberação de citocinas Th1 e geração do NO (Maity *et al.*, 2009).

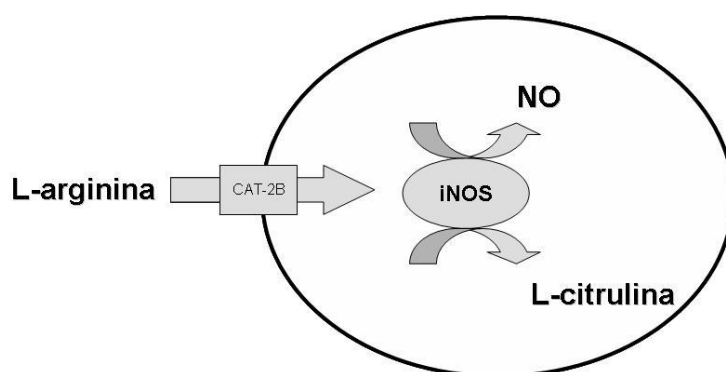


Figura 04: Desenho esquemático da ação da enzima iNOS. A L-arginina é transportada por uma proteína de membrana para o interior da célula, sendo convertida em NO e L-citrulina pela enzima iNOS. Fonte: Sarmiento, 2004.

O LPG é um glicolípido expresso na superfície de membrana dos parasitos, e também determinante de virulência. Esta molécula participa na adesão ao macrófago, confere resistência a *Leishmania* à ação lítica do complemento e, dependendo da espécie, contribui para o estabelecimento da infecção dentro do macrófago, criando condições propícias para a diferenciação de promastigotas em amastigotas (Spath *et al.*, 2000; Handman & Bullen, 2002; Rasmusson & Descoteaux, 2004).

Este glicolípido inibe o sinal de transdução do macrófago e a produção de citocinas, protege as promastigotas do parasito do aumento nos níveis de ROS gerado durante

a fagocitose, além de inibir o arranjo normal dos filamentos de actina ao redor dos fagossomos e, bloquear ou retardar a fusão destes com os lisossomos (Winberg *et al.*, 2007; Naderer & McConville, 2008).

A fosfatidilserina é um fosfolipídio presente na membrana plasmática das promastigotas e possui alta especificidade com receptores na superfície de macrófagos. Esta molécula também é encontrada externalizada na superfície de células apoptóticas (células em processo de morte celular), estimulando a atividade fagocítica do macrófago, porém inibindo sua reação inflamatória (Wanderley *et al.*, 2006). Desta forma, a entrada do parasito por receptores de células apoptóticas do hospedeiro favorece a inibição da ativação da resposta microbida, o que pode ser o fator crítico para a sobrevivência de promastigotas em fagócitos (Naderer & McConville, 2007).

1.2. PRINCIPAIS ORGANELAS E ESTRUTURAS CITOPLASMÁTICAS

O protozoário do gênero *Leishmania* apresenta diversas e diferentes estruturas que estão diretamente envolvidas na sua atividade endocítica e exocítica, e no seu metabolismo próprio, como nutrição, replicação, obtenção de energia e outros. Estas estruturas diferem o metabolismo deste parasito dos de outros tripanossomatídeos, diferenciando-se também entre os diferentes estágios de seu desenvolvimento.

1.2.1. Organelas envolvidas em vias endocíticas

O processo de endocitose nestes parasitos é descrito por muitos autores como forma de nutrição e evasão da resposta imune celular do hospedeiro, sendo, portanto, um importante mecanismo para sobrevivência do parasita durante a infecção (De Souza *et al.*, 2009). Estruturas citoplasmáticas como, bolsa flagelar e megassomo, estão envolvidas nas vias endocíticas próprias deste parasito.

A bolsa flagelar está presente em todos os tripanossomatídeos na porção anterior da célula. Consiste em uma pequena invaginação da membrana plasmática, na qual emerge um flagelo, participando de vários processos celulares, entre estes, intensa e restrita atividade endocítica e exocítica. Esta estrutura complexa pode ser facilmente observada por MET, mostrando uma complexa organização e preciso posicionamento em relação aos elementos do

citoesqueleto e organelas. Em promastigotas de *Leishmania* foram identificadas outras estruturas pertencentes a esta via conhecidas como corpos multivesiculares, estruturas tubulares e túbulos multivesiculares (De Souza, 2002; De Souza *et al.*, 2009; Field & Carrington, 2009).

Corpos multivesiculares são adjacentes ao complexo de Golgi, e constituídos por várias vesículas. Sua função ainda é desconhecida. Estruturas tubulares são arranjos regulares localizados próximo ao complexo de Golgi e a bolsa flagelar. Estas estruturas estão constantemente ligadas a vesículas elétrons lucentes, possível de serem visualizadas por análise ultraestrutural e, participam da via endocítica de promastigotas, sendo a última organela desta via. Túbulos multivesiculares são sítios onde há acúmulo de proteínas e lipídios que são ingeridos pelo parasito e é o compartimento final da via endocítica de promastigotas de *Leishmania*. Amastigotas intracelulares são capazes de ingerir macromoléculas através da bolsa flagelar, estrutura com livre acesso ao vacúolo parasitóforo (De Souza *et al.*, 2009).

Próximo a bolsa flagelar, macromoléculas se aderem e são rapidamente internalizadas, dando origem a pequenas vesículas endocíticas, que brotam destas estruturas. A degradação do material ingerido pelas formas amastigotas de *Leishmania* ocorre no megassomo, última organela presente na rota endocítica destas formas parasitárias. São organelas elétrondensas, delimitadas por membrana, que variam de forma e tamanho, podendo alcançar o diâmetro do núcleo da célula. Sua matriz não é homogênea, apresentando densas inclusões e vesículas. Devido ao seu caráter ácido, acúmulo de agentes lisossomotrópicos e hidrolases lisossômicas, como cisteína proteinase, relacionada com a infectividade do parasito, esta organela é conhecida por apresentar características lisossômicas. Sua biogênese tem sido descrita somente durante a diferenciação *in vitro* de promastigotas para amastigotas. As formas promastigotas possuem muitas vesículas pequenas elétrons lucentes que acumulam cisteína proteinase, consideradas de megassomo precursor (De Souza, 2002; De Souza *et al.*, 2009).

Marcadores moleculares estão sendo bastante utilizados para identificar compartimentos endocíticos, o que contribui para o entendimento do tráfego intracelular em células eucarióticas, incluindo tripanossomatídeos (De Souza *et al.*, 2009).

1.2.2. Organelas envolvidas em vias metabólicas

A diferença entre as formas de *Leishmania* e tripanossomatídeos já descrita refere-se, principalmente, ao metabolismo de carboidratos, como a manose (reserva energética), e aminoácidos. Aminoácidos e açúcares podem ser utilizados como fontes de energia, a partir do metabolismo de glicossomos e mitocôndrias, que contém uma ativa cadeia de transporte de elétrons. Glicossomos são estruturas delimitadas por membrana, onde há metabolização e degradação de açúcares. Pouco se sabe a cerca do funcionamento desta organela, mas estudos demonstraram que sua presença é abundante em amastigotas, demonstrando a variação no metabolismo das organelas quanto ao estágio de diferenciação do parasito (Opperdoes & Coombs, 2007).

Diferentes organelas intracelulares estão envolvidas na regulação da homeostase de íons em protozoários parasitos, como, por exemplo, o retículo endoplasmático, mitocôndrias e acidocalcissomo (Miranda *et al.*, 2008).

O acidocalcissomo é uma organela ausente no metabolismo das células de mamíferos, apresenta caráter ácido e grande elétron densidade. Foi descrita em protozoários em 1958, e recebeu inúmeras denominações tais como: reservatórios de produtos metabólicos, grânulos osmiofíticos, grânulos de voluntina ou grânulos de polifosfato. Esta organela armazena cálcio, é rico em pirofosfato, magnésio, sódio, potássio, e em alguns casos zinco, além de uma baixa concentração de cloro e enxofre (Miranda, *et al.*, 2000; Moreno & Docampo, 2003). Possui várias funções, dentre elas o estoque de cálcio e fósforo, homeostase de cálcio, manutenção do equilíbrio do pH intracelular e osmoregulação, realizados devido a presença de bombas (Ca^{2+} -ATPase, V- H^{+} -ATPase, H^{+} -PPase), transportadores ($\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$, $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$), e canais (aquaporinas) na sua membrana (Docampo & Moreno, 2001; Docampo & Moreno, 2008; Miranda *et al.*, 2008).

A quantidade de cálcio, fósforo e outros cátions encontrados nesta organela podem variar de acordo com o processamento utilizado para microscopia eletrônica. Na rotina, parte desse material elétrondenso pode ser removido. Para visualização de íon cálcio, dentro de acidocalcissomos, as células são fixadas na presença de piroantimoniato de potássio, e aparecem geralmente como estruturas esféricas de grande diâmetro. Podem ser vistos em toda a célula, entretanto, são preferencialmente encontrados na periferia celular. O número de acidocalcissomos pode variar entre espécies, e também entre os vários estágios de desenvolvimento da mesma espécie (De Souza, 2002).

Outra organela característica destes parasitos é o hidrogenossomo, envolvido, principalmente, no processo de produção de ATP e hidrogênio, e apresenta como característica a presença de vesículas periféricas. Quando os parasitos são incubados em meios citoquímicos para localização de proteínas básicas e cálcio, a reação pode ser observada por toda a matriz desta organela (De Souza, 2002).

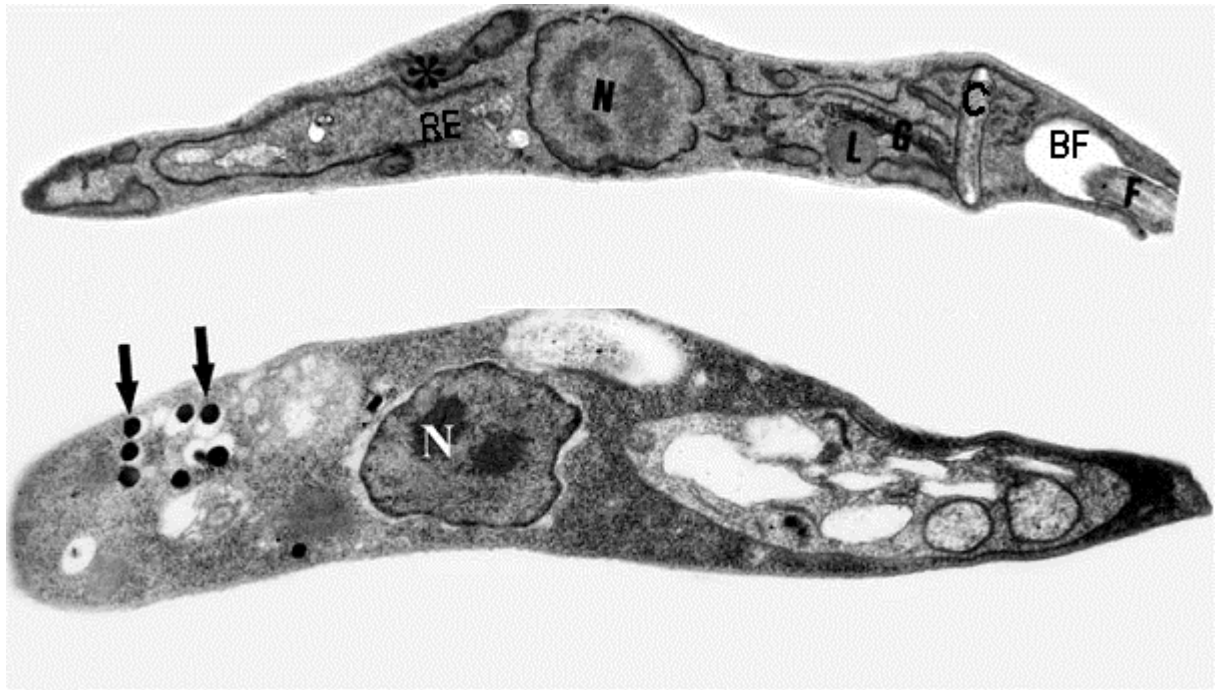


Figura 05: Principais estruturas e organelas citoplasmáticas de promastigota do gênero *Leishmania* em Microscópio Eletrônico de Transmissão. (A) Parasito com morfologia típica, contendo flagelo (F), bolsa flagelar (BF), cinetoplasto (C), complexo de Golgi (G), inclusão lipídica (L), núcleo (N), retículo endoplasmático (RE) e mitocôndria (*). (B) Visualização de acidocalcissomos (setas), com matriz eletróndensa. Fonte: Corrêa *et al.*, 2007 (modificada).

2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são zoonoses consideradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das seis maiores endemias, infectando cerca de dois milhões de pessoas no mundo todo.

A LTA tornou-se um problema de saúde crescente no Brasil. A incidência aumentou de 10,45 casos por 100.000 indivíduos em 1985 para 18,63 casos por 100.000 indivíduos em 2000. O perfil da doença no país está mudando, devido à expansão humana para áreas endêmicas florestais, de uma zoonose transmitida acidentalmente ao homem, para uma doença de interface rural-urbana (Chagas *et al.*, 2006). Na região Norte o aumento na incidência dos casos está ocorrendo devido ao processo de exploração da Amazônia.

Segundo dados do Ministério da Saúde, na região Norte foram notificados aproximadamente 45% dos casos em 2008, predominando os estados do Pará, Amazonas e Acre na região. No estado do Pará, no ano de 2006, foram notificados 3.554 casos de LTA, 4.305, em 2007, e 3.616 casos no ano de 2008, dados ainda parciais (Brasil, 2009). Estes casos confirmam o caráter endêmico da doença no Estado.

Devido à existência de uma multiplicidade de cepas causadoras da leishmaniose tegumentar (cutânea e mucocutânea) por *L. (V.) braziliensis*, torna-se importante o conhecimento de aspectos básicos do parasito, bem como seu aspecto ultraestrutural, na tentativa de caracterizar componentes fundamentais para seu desenvolvimento e, conseqüentemente, obter um melhor entendimento do metabolismo desses agentes. Estes dados são fundamentais para a futura identificação de possíveis alvos para ação de drogas terapêuticas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar e comparar através de análise ultraestrutural e citoquímica por microscopia eletrônica de transmissão duas cepas de *L. (V.) braziliensis*, isoladas de diferentes casos clínicos, em diferentes fases do crescimento.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a morfologia de formas promastigotas de duas cepas de *L. (V.) braziliensis* por microscopia eletrônica de transmissão, obtidas na fase logarítmica e estacionária de cultivo *in vitro*;
- Caracterizar e comparar por métodos citoquímicos estruturas e organelas das cepas estudadas nos diferentes dias de cultivo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CULTIVO E MANUTENÇÃO DO PARASITO

As cepas de *L. (V.) braziliensis* (M17593 – cepa cutânea; M17323 – cepa mucocutânea) foram obtidas nas formas promastigotas em meio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) provenientes do Programa de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas, e mantidas em meio RPMI 1640, suplementadas com Soro Bovino Fetal (SBF) a 10% e GPPS a 1% (Glutamina 0,2 M; Ácido pirúvico 0,0125 M; Penicilina/Estreptomicina 5 mM) em estufa B. O. D. (Biochemical Oxygen Demand) Quimis[®] à 27 °C, repicados a cada sete dias, na fase exponencial de crescimento.

4.2. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os parasitos das cepas M17593 (cutânea) e M17323 (mucocutânea) com sete (fase estacionária) e dez (fase logarítmica) dias de cultura foram fixados em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído tipo II (70%), 4% de paraformaldeído e 2,5% de sacarose, em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7,2. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes em tampão cacodilato 0.1 M e posteriormente incubadas em solução contendo: tetróxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio 0,8% por 1 hora, à temperatura ambiente. As células foram lavadas três vezes em tampão cacodilato 0.1 M, durante dez minutos cada, e então desidratadas em 50%, 70%, 90% e três vezes em 100%, por dez minutos cada série crescente de acetona durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após a desidratação, as células foram lentamente infiltradas em resina Epon[®] nas seguintes concentrações: 2:1, 1:1 e 1:2 (acetona 100%: Epon[®] - 12 horas em cada etapa). A seguir o material foi incluído em Epon[®] puro por 6 horas e depois em suporte para polimerização à 60 °C por 48 horas. Os blocos polimerizados foram cortados em ultramicrótomo (Leica EM UC6) e os cortes obtidos foram contrastados durante 20 minutos com acetato de uranila 5% e, posteriormente, durante cinco minutos com citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico de transmissão LEO 906 E.

4.3. ANÁLISE CITOQUÍMICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

4.3.1. Detecção de lipídios pelo método ósmio-imidazol (Angermüller & Fahimi, 1982)

As cepas de *L. (V.) braziliensis* em diferentes dias de cultivo foram fixadas como descrito no item 4.2. Após a fixação, as células foram lavadas uma vez em tampão cacodilato 0.1 M, pH 7,2 e uma vez em tampão imidazol 0.1 M, pH 7,5. Posteriormente, foi realizada a pós-fixação das células em tetróxido de ósmio a 2% em tampão imidazol 0.1 M, pH 7,5 por 30 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. As células foram lavadas duas vezes em tampão imidazol 0.1 M e então desidratadas em acetona e incluídas em resina Epon®. Os cortes ultrafinos obtidos foram contrastados durante 20 minutos com acetato de uranila 5%, e posteriormente durante cinco minutos com citrato de chumbo e observados em MET.

4.3.2. Detecção de sítios de cálcio pela técnica de piroantimoniato de potássio (Spicer *et al.*, 1968)

Os parasitos das cepas em diferentes dias de cultivo foram fixados como descrito no item 4.2 e lavados duas vezes em tampão cacodilato 0,1M, pH 7.2, à temperatura ambiente e duas vezes em tampão fosfato de potássio, pH 7.5. Posteriormente, a amostra foi submetida a uma pós-fixação em solução contendo tetróxido de ósmio a 1% com piroantimoniato de potássio a 2,5% em tampão fosfato de potássio pH 7,4 – 7.8, por 1 hora, à temperatura de 4 a 8 °C, protegido da luz. Após esse período, as células foram lavadas em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7.5, duas vezes, dez minutos cada e, à temperatura ambiente. Posteriormente, desidratadas em concentrações crescentes de acetona e processadas como descrito no item 4.2. Para controle de especificidade da técnica, os cortes ultrafinos foram imersos em uma solução de EGTA 5 mM durante 20 minutos, à temperatura ambiente de 60 °C. O EGTA é um composto orgânico que atua como agente quelante, formando um complexo estável com íons cálcio. Em seguida, foram lavados em água destilada, corados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo, e observados em MET.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Na análise ultraestrutural por MET de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foi possível identificar morfologia típica do parasito, além de estruturas fundamentais para sobrevivência e metabolismo, como núcleo bem definido, cinetoplasto anterior ao núcleo, bolsa flagelar e flagelo, em ambas as cepas.

Nas promastigostas da cepa M17593 cultivadas até a fase logarítmica (LOG), além da visualização das estruturas básicas para o parasito, também foi observado muitas estruturas semelhantes a inclusões lipídicas e estruturas sugestivas de acidocalcissomos (Figura 06-A). Entretanto, nas células cultivadas até a fase estacionária (EST) poucas destas estruturas foram visualizadas (Figura 06-B). Na cepa M17323, estruturas sugestivas de inclusões lipídicas, também foram observadas, porém, promastigotas da fase EST parecem apresentar maior distribuição destas inclusões (Figura 06-D), quando comparado com aquelas da fase LOG (Figura 06-C).

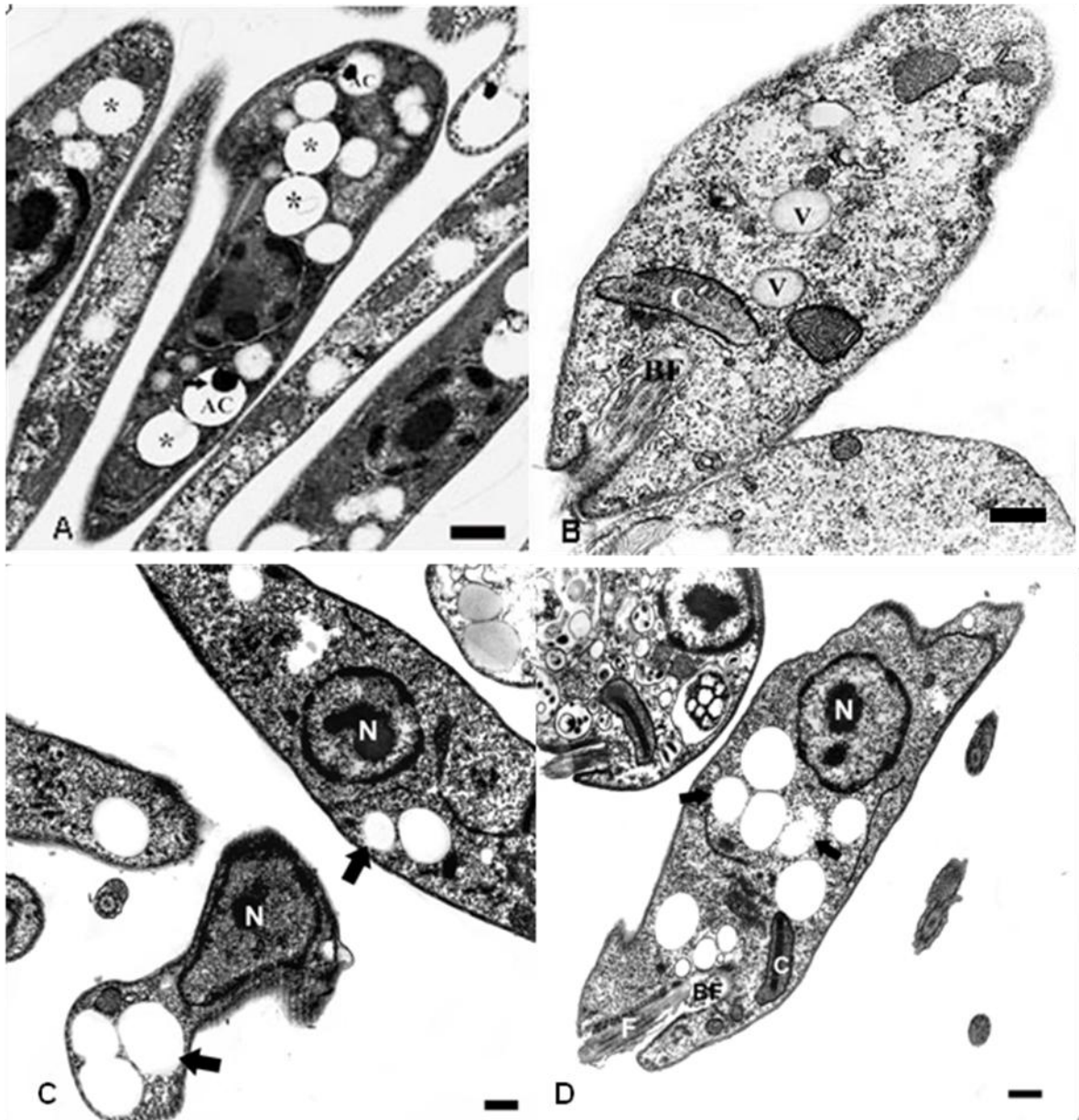


Figura 06: Promastigotas de duas cepas de *L. (V.) braziliensis* em diferentes dias de cultivo *in vitro* por MET. (A) Cepa M17593 na fase LOG. Observar a presença de estruturas características de inclusões lipídicas (*) e acidocalcissomo (AC). Notar a presença de material elétron denso no interior da organela (seta). (B) Na fase EST, observar menor distribuição de inclusões lipídicas e aparente ausência de acidocalcissomos. (C) Cepa M17323 na fase LOG. Observar estruturas semelhantes às inclusões lipídicas (setas) sem estruturas semelhantes à AC abundantes. (D) Na fase EST. Estruturas características de inclusões lipídicas (setas) presentes em maior quantidade, com aparente ausência de AC. N - núcleo; C - cinetoplasto; BF - bolsa flagelar; F - flagelo; V - vacúolos. Barras: (A-D): 1µm.

5.2. ANÁLISE CITOQUÍMICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

5.2.1. Detecção de lipídios pelo método ósmio-imidazol

A análise citoquímica para detecção de lipídios em MET de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, permitiu confirmar a presença de inclusões lipídicas no protozoário, como estruturas circulares, com material elétron denso, distribuídas no citoplasma do parasito.

Assim como observado na análise ultraestrutural de rotina, as marcações, que caracterizam as inclusões lipídicas, nas promastigotas da cepa M17593 apresentavam maior distribuição na fase LOG (Figura 07-A) quando comparadas com promastigotas da fase EST, onde se mostraram como grandes estruturas elétrondensas (Figura 07-B). Na cepa M17323 foi visto maior distribuição das inclusões lipídicas na fase EST (Figura 07-D), ao passo que na fase LOG estas estruturas aparentemente demonstraram menor distribuição, porém maiores inclusões (Figura 07-C).

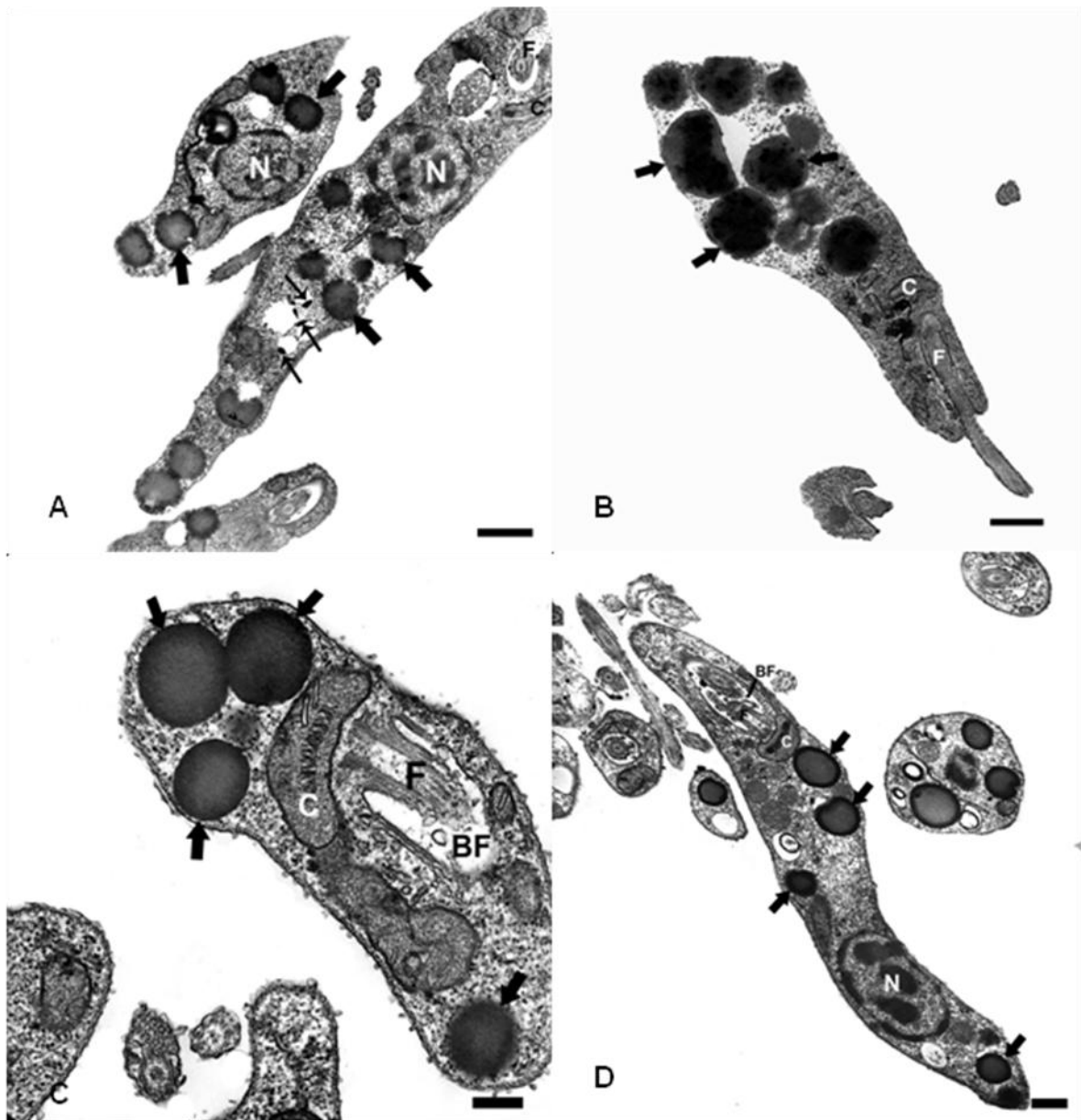


Figura 07: Identificação citoquímica ultraestrutural pelo método ósmio-imidazol de promastigotas de duas cepas de *L. (V.) braziliensis* em diferentes dias de cultivo *in vitro*. (A) Cepa M17593 na fase LOG. Observar a presença de inclusões lipídicas, como estruturas elétrondensas distribuídas por todo o protozoário (seta grande) e, ainda o grande número de estruturas semelhantes à acidocalcisomo (seta fina). (B) Na fase EST. Observar menor distribuição de inclusões lipídicas (seta). (C) Cepa M17323 na fase LOG. Notar inclusões lipídicas na célula (setas). (D) Na fase EST. Notar aparentemente maior distribuição das inclusões (setas). N - núcleo; C - cinetoplasto; BF - bolsa flagelar; F - flagelo. Barras: (A) 1 μ m; (B-D) 2 μ m.

5.2.2. Detecção de sítios de cálcio pela técnica de piroantimoniato de potássio

Com esta técnica, foi possível observar nas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* a presença de sítios de cálcio pela célula, além da organela acidocalcissomo, estrutura citoplasmática, com material elétron denso, delimitada por uma unidade de membrana.

Na cepa M17593, durante a fase LOG, há presença de vários acidocalcissomos (Figura 08-A), enquanto que nas promastigotas da fase EST do crescimento analisadas, não foi encontrado tais estruturas em abundância. Além disso, a distribuição do cálcio nas células da fase EST mostrou-se mais limitada, estando, contudo, concentrado na membrana celular do parasito, principalmente, próximo à bolsa flagelar e ao flagelo (Figura 08-B). Na cepa M17323 cultivada até a fase LOG, também se identificou a presença de vários acidocalcissomos e sítios de cálcio distribuídos pelo citoplasma (Figura 08-C). Nas promastigotas cultivadas até a fase EST dessa cepa foi identificada intensa marcação de sítios de cálcio distribuídos por toda célula e na membrana, além de menor distribuição de acidocalcissomo (Figura 08-D).

A realização da técnica de controle do método citoquímico, utilizando EGTA 5 mM, permitiu confirmar a presença destes íons nas células de ambas as cepas, devido a remoção do precipitado elétron denso (Figura 09).

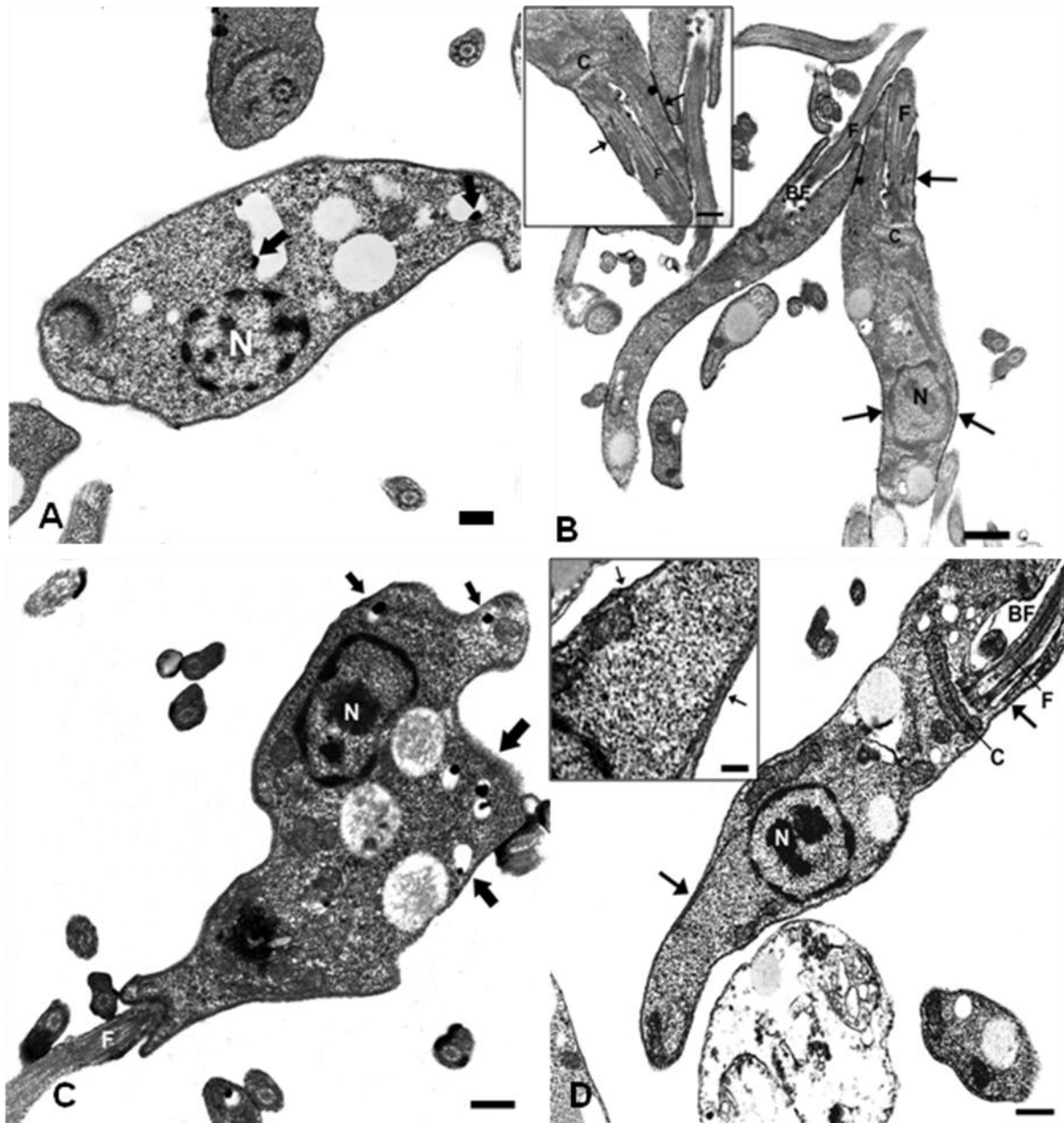


Figura 08: Identificação citoquímica ultraestrutural pela técnica de piroantimoniato de potássio de promastigotas de duas cepas de *L. (V.) braziliensis* em diferentes dias de cultivo *in vitro*. (A) Cepa M17593 na fase LOG. Observar a presença de acidocalcissomos (setas), e estruturas elétrondensas distribuídas no citoplasma parasito, sugestivo de íons Ca^{2+} . (B) Na fase EST. Menor distribuição de acidocalcissomo, e presença de íons Ca^{2+} concentrado na membrana da célula (setas), principalmente próximo à bolsa flagelar e flagelo (inset). (C) Cepa M17323 na fase LOG. Observar a presença de acidocalcissomos (setas) e íons Ca^{2+} distribuídos pelo citoplasma (D) Na fase EST. Pouca distribuição da organela, e presença de íons Ca^{2+} na membrana (setas) e no citoplasma (inset). N - núcleo; C - cinetoplasto; BF - bolsa flagelar; F - flagelo. Barras: (A-D): 2 μm ; (Inset B): 2 μm ; (Inset D): 1 μm .

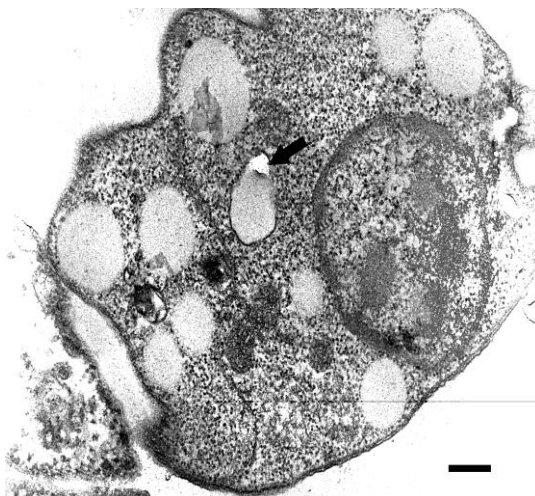


Figura 09: Controle da técnica de piroantimoniato de potássio em promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, utilizando solução de EGTA 5 mM. Observar a organela acidocalcissomo sem o material elétrondenso (seta). Barra: 2 μ m.

5.3. ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS

A Tabela 1 permite analisar de maneira geral a diferença no padrão de distribuição dos componentes citoplasmáticos identificados entre as cepas do parasito em diferentes fases do crescimento.

Na fase LOG foi observada maior distribuição de inclusões lipídicas nas promastigotas da cepa cutânea (M17593), porém de menor tamanho. Neste período do crescimento, ambas apresentaram maior distribuição da organela acidocalcissomo e poucos sítios de cálcio na membrana plasmática do parasito. Quanto à distribuição de íons cálcio no citoplasma, a cepa mucocutânea (M17323) apresentou maior marcação.

Na fase EST a cepa mucocutânea apresentou maior distribuição de inclusões lipídicas. Ambas as cepas não apresentaram ampla distribuição de acidocalcissomo, mas continham grande quantidade de sítios de cálcio na membrana, principalmente próximo à bolsa flagelar. Assim como na fase LOG, a forma promastigota desta cepa apresentou maior marcação de sítios de cálcio distribuídos no citoplasma, quando comparada com a cepa cutânea.

Tabela 1: Diferença na distribuição de componentes citoplasmáticos identificados nas cepas de *L. (V.) braziliensis* nos diferentes dias de cultivo.

	Fase logarítmica		Fase estacionária	
	Cepa C (M17593)	Cepa MC (M17323)	Cepa C (M17593)	Cepa MC (M17323)
Distribuição de Inclusões Lipídicas	↑	↓	↓	↑
Distribuição de Acidocalcissomos	↑	↑	↓	↓
Presença de sítios do íon Ca^{2+} na membrana	↓	↓	↑	↑
Presença de sítios do íon Ca^{2+} no citoplasma	↓	↑	↓	↑

C = cutânea; MC = mucocutânea

(↑) = maior distribuição

(↓) = menor distribuição

6. DISCUSSÃO

Nos últimos dez anos o número de casos relatados de pacientes com LTA no Brasil, principalmente na região Amazônica, aumentou consideravelmente. Esta zoonose possui uma diversidade de agentes, reservatórios e vetores que apresentam diferentes padrões de transmissão e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos, o que a torna esta doença de difícil controle (Brasil, 2007; Reithinger *et al.*, 2007).

Diversos estudos foram realizados para determinar processos bioquímicos e moleculares da *Leishmania* e várias moléculas já foram caracterizadas como, por exemplo, as proteinases, enzimas expressas em abundâncias e associadas com vários processos patogênicos, podendo representar alvos quimioterápicos, a partir do bloqueio seletivo de suas funções no ciclo de vida e na interação parasito-hospedeiro (Rebello *et al.*, 2009). Métodos citoquímicos e imunocitoquímicos associados com microscopia eletrônica de transmissão foram utilizados para localização de proteínas básicas, DNA, ribonucleotídeos, carboidratos, e outras moléculas nos vários tipos celulares (Cavalcanti *et al.*, 2008).

A análise ultraestrutural dos resultados obtidos no presente trabalho, confirmados pela análise citoquímica pelo método ósmio-imidazol, mostraram a presença de inclusões lipídicas no citoplasma da forma promastigota das diferentes cepas de *L. (V) braziliensis*, tanto na fase LOG como na fase EST, indicando que este protozoário acumula no seu citoplasma lipídios de reserva, necessários para seu crescimento e desenvolvimento, e parecem estar diretamente associado com a habilidade de infectar o hospedeiro e causar doença (Cronan, 2006; Mazumdar & Striepen, 2007).

Os lipídios são componentes fundamentais para todos os seres vivos. Estão envolvidos na formação das membranas celulares, reserva de energia e desempenham importante papel na modificação pós-transducional que regula a localização e função de uma variedade de proteínas (Mazumdar & Striepen, 2007). A maioria das células eucarióticas armazena triglicerídeos como uma fonte de reserva endógena de energia. Os triglicerídeos acumulam-se no citoplasma das células sob a forma de inclusões lipídicas. Após fixação para MET, estas inclusões aparecem como estruturas circulares, com matriz homogênea, geralmente elétron lucente e não são limitadas por uma unidade de membrana (Soares, 2007).

A partir da análise comparativa entre as promastigotas da cepa cutânea (M17593), forma clínica mais branda da LTA, processadas em diferentes períodos do crescimento, foi observado um padrão diferente de distribuição e no tamanho das inclusões lipídicas no citoplasma do parasito. A maior quantidade de tais inclusões na fase LOG pode ser explicada

pela necessidade energética do parasito, período em que há maior atividade metabólica das células e constante divisão celular, havendo, portanto, neste caso, um grande consumo de lipídios para seu crescimento.

A diferença na distribuição das inclusões lipídicas nas promastigotas da cepa mucocutânea (M17323), cepa causadora da forma clínica mais agressiva da doença, onde aparentemente foi observado maior quantidade na fase EST, pode estar relacionado com a manifestação clínica doença, havendo necessidade do parasito em acumular lipídios para a interação com a célula hospedeira. Ramos *et al.* (2009) ao utilizarem o método ósmio-imidazol para caracterização de uma cepa de *L. (V.) shawi*, responsável por leishmaniose cutânea, obtiveram resultados semelhantes, porém ainda ao realizarem análise da composição lipídica, verificaram maior concentração de triglicerídeos na fase EST, confirmando a importância do metabolismo de lipídios para virulência, crescimento, replicação e diferenciação de espécies de *Leishmania* no hospedeiro.

Os resultados obtidos também permitiram a realização de uma análise comparativa entre as cepas. Na fase LOG, a cepa cutânea (M17593) apresentou maior distribuição de inclusões lipídicas, porém de menor tamanho. Na fase EST a cepa mucocutânea (M17323), foi quem apresentou maior distribuição destas estruturas. Como dito anteriormente, esta diferença na distribuição de lipídios nas fases de crescimento pode ter correlação com a manifestação clínica da LTA.

Além dos lipídios, íons como o cálcio são fundamentais para a manutenção do ciclo de vida de diferentes parasitos, estando envolvidos no processo de invasão da célula hospedeira (Miranda *et al.*, 2008). O cálcio é reconhecido como principal sinalizador intracelular, no qual através de estímulos externos são responsáveis por respostas celulares cruciais em células eucarióticas. Existem poucos estudos envolvendo protozoários parasitos e o íon cálcio demonstrando sua função no metabolismo, na sobrevivência e no ciclo biológico (Prasad *et al.*, 2001).

Moreno e Docampo (2003) observaram mudanças na concentração intracelular de cálcio em protozoários, como *L. (L.) amazonensis*, durante a interação com a célula hospedeira. Estes autores demonstraram que o uso de agentes quelantes de cálcio diminui a invasão de células hospedeiras por formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Além disso, demonstraram também a importância do cálcio durante o processo de diferenciação da espécie *Leishmania donovani*.

Neste estudo, a visualização de estruturas semelhantes à acidocalcisomo em *L. (V.) braziliensis* em MET, confirmados pela técnica de piroantimoniato de potássio, permitiu

não só a observação da organela, como também detecção de sítios de cálcio como estruturas elétrondensas distribuídos pelo citoplasma. A maior quantidade destas organelas em promastigotas de ambas as cepas, obtidas na fase LOG, é justificada pela necessidade de utilização dos íons, principalmente cálcio, para seu crescimento e processos metabólicos, como a manutenção da homeostase dada pela organela.

Resultados semelhantes foram obtidos por Souza (2002) utilizando *Trypanosoma* sp. Os autores sugerem que a presença de acidocalcissomos em maior quantidade na fase LOG é devido à maior necessidade metabólica de íons Ca^{2+} na multiplicação e nas mudanças morfológicas que ocorrem nesta fase de crescimento quando comparado à fase EST.

Vercesi *et al.* (2000) detectaram transportadores Na^+/H^+ em acidocalcissomos de *L. donovani*. Este transportador parece regular diversos mecanismos de sinalização intracelular, como o de proteínas cinases na *Leishmania*, as quais estão envolvidas com a patogênese da doença. Este dado, portanto, confirma a hipótese de que a organela desempenha importantes funções na fisiologia do parasito.

Dados da literatura ainda demonstram a função do acidocalcissomo na adaptação do parasito a diferentes condições ambientais, que é um fator para o estabelecimento da infecção por organismos digenéticos. Estudos com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* mostraram que dependendo deste fator, as células podem apresentar esta organela com estrutura e propriedades químicas diferentes. Desta forma, é uma evidência que o acidocalcissomo está envolvido na sensibilidade e adaptação às características do meio onde se encontram os parasitos submetidos a mudanças de pH e temperatura, por exemplo (Mirada *et al.*, 2004).

Neste trabalho, foi possível observar que na fase EST, também conhecida como fase infectiva, a maior presença de íons cálcio na membrana de ambas as cepas do parasito, principalmente, próximo à bolsa flagelar e flagelo, pode estar diretamente relacionado ao processo de interação com a célula do hospedeiro vertebrado. No nosso estudo a análise comparativa das cepas indicou que ambas apresentaram aparentemente maior distribuição da organela acidocalcissomo na fase LOG. Na fase EST, ambas as cepas não apresentaram ampla distribuição da organela, mas continham grande quantidade de sítios de cálcio na membrana, principalmente próximo à bolsa flagelar. A cepa M17323 (mucocutânea) apresentou maior quantidade de sítios de cálcio distribuídos pelo citoplasma quando comparada com a cepa M17593 (cutânea).

Nossos dados também demonstraram que as formas promastigotas na fase EST, de todas as cepas estudadas, apresentaram sítios de cálcio distribuídos no citoplasma, porém a

forma promastigota da cepa mucocutânea apresentou maior marcação. Desta forma, pode-se dizer que este dado pode ter relação direta e/ou indireta com a manifestação clínica dada pela infecção com esta cepa do parasito, que pode utilizar, portanto, mais íons para o processo de interação com a célula do hospedeiro e, por conseguinte, levar ao desenvolvimento da forma mais agressiva da doença.

A função do cálcio como biomodulador no ciclo de vida de patógenos protozoários não está completamente esclarecida (Prasad *et al.*, 2001). Sabe-se, porém, que a organela citoplasmática acidocalcissomo constitui um potente alvo para quimioterápicos de doenças provocadas por protozoários parasitos, não somente porque se encontram ausentes em mamíferos, mas também, pela sua característica ácida, permitindo o acúmulo de drogas alcalinas, aumentando potencialmente sua toxicidade (Docampo & Moreno, 2008).

Este estudo, portanto, permitiu observar características importantes que permitem diferenciar formas promastigotas de cepas de *L. (V.) braziliensis* isoladas de diferentes manifestações clínicas e obtidas em diferentes dias de cultivo *in vitro*. Estudos acerca da estrutura e função do acidocalcissomo, além de outras estruturas citoplasmáticas em protozoários parasitos da espécie, são importantes para obtenção de conhecimento sobre a sua fisiologia, identificando possíveis alvos para ação de drogas terapêuticas, além de uma possível correlação destas com os diferentes comportamentos clínicos da doença.

7. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados e discutidos permitem concluir que:

- As formas promastigotas de ambas as cepas de *L. (V.) braziliensis* apresentaram inclusões lipídicas, acidocalcissomos e sítios de íons cálcio distribuídos pelos parasitos obtidos em diferentes dias de cultivo *in vitro*;
- Promastigotas da cepa cutânea de *L. (V.) braziliensis* apresentaram maior distribuição de inclusões lipídicas durante a fase logarítmica, enquanto que, promastigotas da cepa mucocutânea apresentaram maior distribuição de inclusões durante a fase estacionária;
- As duas cepas de *L. (V.) braziliensis* estudadas apresentaram maior distribuição da organela acidocalcissomo na fase logarítmica, e presença marcante de íons cálcio na membrana do parasito na fase estacionária.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGERMÜLLER, S. & FAHIMI, H. D. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. **Histochem J**, **14**: 823-835. 1982.
- BAILEY, M. S. & LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous leishmaniasis. **Clin Dermatol**, **25**: 203-211. 2007.
- BATES, P. A. Housekeeping by *Leishmania*. **Trends Parasitol**, **22**: 447–448. 2006.
- BATES, P. A. The Developmental Biology of *Leishmania* Promastigotes. **Exp Parasitol**, **79**: 215-218. 1994.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial. Série A. Normas e Manuais Técnicos. **Brasília: Editora MS**, 2006. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/atlas_lta.pdf. Último acesso em: 26/10/2009.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Série A. Normas e Manuais Técnicos. **Brasília: Editora MS**, 2ª Ed., 2007. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf. Último acesso em: 19/06/2009.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Situação Epidemiológica: Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2008. Brasília/DF, 2009. Disponível em: http://189.28.128.100/portal/arquivos/pdf/casos_lta_br_gr_uf_1990_2008.pdf. Último acesso em: 26/10/2009.
- CAMPOS, M. B.; GOMES, C. M. C.; SOUZA, A. A. A.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. & SILVEIRA, F. T. *In vitro* infectivity of species of *Leishmania* (*Viannia*) responsible for American cutaneous leishmaniasis. **Parasitol Res**, **103**: 771-776. 2008.
- 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.
- CHAGAS, A. C.; PESSOA, F. A. C.; DE MEDEIROS, J. F.; PY-DANIEL, V.; MESQUITA, É. C. & BALESTRASSI, D. A. Leishmaniose TegumentarAmericana (LTA) em uma vila de exploração de minérios - Pitinga, município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. **Rev Bras Epidemiol**, **9**: 186-192. 2006.
- CHANG, K. & CHAUDHURI, G. Molecular determinants of *Leishmania* virulence, **Annu Rev Microbiol**, **44**: 499-529. 1990.
- CORRÊA, J. R.; BRAZIL, R. P. & SOARES, M. J. *Leishmania (Viannia) lainsoni* (Silveira *et al.*, 1987): ultrastructural aspects of the parasite and skin lesion in experimentally infected hamster (*Mesocricetus auratus*). **Parasitol Res** **100**: 1227-1232. 2007.
- CRONAN, J. E. Avant Garde Fatty Acid Synthesis by trypanosomes. **Cell**, **126**: 641-643. 2006.
- CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. **Exp Mol Pathol**, **72**: 132-141. 2002.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, **27**: 305-318. 2004.
- DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitol Res**, **88**: 1013-1025. 2002.
- DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C. & CUNHA-E-SILVA, N. L. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. **Prog Histochem Cytochem**, **44**: 67-124. 2009.
- DOCAMPO, R. & MORENO, S. N. J. The Acidocalcisome as a Target for Chemotherapeutic Agents in Protozoan Parasites. **Curr Pharm Des**, **14**: 882-888. 2008.
- DOCAMPO, R. & MORENO, S. N. J. The acidocalcisome. **Mol Biochem Parasitol**, **33**: 151-159. 2001.
- ESTERRE, P.; DEDET, J. P.; FRENAY, C.; CHEVALLIER, M. & GRIMAUD, J. A. Cell populations in the lesion of human cutaneous leishmaniasis: a light microscopical, immunocytochemical and ultrastructural study. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, **421**: 239-247. 1994.
- FIELD, M. C. & CARRINGTON, M. The trypanosome flagellar pocket. **Nat Rev Microbiol**, **7**: 775-786. 2009.

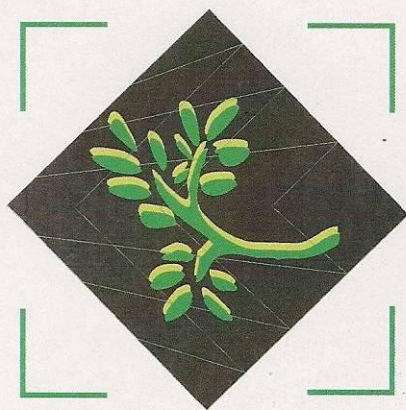
- GOMES-SILVA, A.; BITTAR R. C.; NOGUEIRA, R. S.; AMATO, V. S. ; MATTOS, M. S.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; COUTINHO, S. G. & CRUZ, A. M. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? **Clin Exp Immunol**, **149**: 440-444. 2007.
- GOMES-SILVA A.; SOUZA, M. A.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; ANDRADE, L. R.; DIETZE, R.; LEMOS, E.; BELLI, A.; JÚNIOR, S. F. & FERREIRA, M. S. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. **Rev Soc Bras Med Trop**, **41**: 135-141. 2008.
- GONZÁLEZ U.; PINART M.; RENGIFO-PARDO M.; MACAYA A.; ALVAR J. & TWEED J.A. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database Syst Rev**, **2**. 2009 (no prelo).
- GRIMALDI JR., G. & TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin Microbiol Rev**, **6**: 230-250. 1993.
- 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**, **10**: 100-111. 2008.
- HANDMAN, E. & BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitol**, **18**: 332-334. 2002.
- HENRIQUES, C.; ATELLA, G. C.; BONILHA, V. L. & DE SOUZA, W. Biochemical analysis of proteins and lipids found in parasitophorous vacuoles containing *Leishmania amazonensis*. **Parasitol Res**, **89**: 123-133. 2003.
- 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.
- JU, O.; GROVE, D. I.; JAKSIC, W. J. & DART, G. W. Visceral leishmaniasis: a trip to the Greek Islands is not always idyllic. **Med J Aust**, **181**: 446-447. 2004.
- MAITY, P. C.; BHATTACHARJEE, S.; MAJUMDAR, S. & SIL, A. K. Potentiation by cigarette smoke of macrophage function against *Leishmania donovani* infection. **Inflamm Res**, **58**: 22-29. 2009.
- MAUËL, J. Macrophage-Parasite Interactions in *Leishmania* Infections. **J Leukoc**

- Biol** 47:187–193. 1990.
- MAZUMDAR, J & STRIEPEN, B. Make it ou take it: fatty acid metabolism of Apicomplexan parasites. **Eukaryot Cell**, 6:1727-1735. 2007
- MCCONVILLE, M. J.; DE SOUZA, D.; SAUNDERS, E.; LIKIC, V. A. & NADERER, T. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes . **Trends in Parasitol**, 23: 368–375. 2007.
- MIRANDA, K.; BENCHIMOL, M.; DOCAMPO, R. & DE SOUZA, W. The fine structure of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Res**, 86: 373-384. 2000.
- MIRANDA, K.; DE SOUZA, W.; PLATTNER, H.; HENTSCHEL, J.; KAWAZOE, U.; FANG, J. & MORENO, S. N. J. Acidocalcisomes in Apicomplexan parasites. **Exp Parasitol**, 118: 2–9. 2008.
- MISHRA, B. B.; KALE, R. R.; SINGH, R. K. & TIWARI, V. K. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia**, 80: 81–90. 2009.
- MORENO, S. N. & DOCAMPO, R. Calcium regulation in protozoan parasites. **Curr Opin Microbiol**, 6: 359-64. 2003.
- MORGADO, F. N.; SCHUBACH, A.; ROSALINO, C. M. V.; QUINTELLA, L. P.; SANTOS, G.; SALGUEIRO, M. & CONCEIÇÃO, S. Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? **Br J Dermatol**, 158: 50–58. 2008.
- NADERER, T. & MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cell Microbiol**, 10: 301-308. 2008.
- NEUBER, H. Leishmaniasis. **J Dtsch Dermatol Ges**, 6: 754-65. 2008.
- NOGUEIRA, M.F.; SOTTO, M.N. & CUCÉ, L.C. American tegumentary leishmaniasis: Langerhans cells in Montenegro skin test. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 50: 283-286. 2008.
- OPPERDOES, F. R. & COOMBS, G. H. Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. **Trends Parasitol**, 23: 149-158. 2007.
- 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.
- RAMOS, P. K.; DINIZ, J. A.; SILVA, E. O.; QUARESMA, J. A.; SARAIVA, E. M.; SEABRA, S. H.; ATELLA, G. C. & DE SOUZA, W. Characterization *in vivo* and *in vitro* of a strain of *Leishmania (Viannia) shawi* from the Amazon Region.

- Parasitol Int**, **58**:154-160. 2009.
- RASMUSSEN, B. & DESCOTEAUX, A. Contribution of Electron and confocal microscopy in the study of *Leishmania*-macrophage interactions. **Microsc Microanal**, **10**: 656–661. 2004
- REBELLO, K. M.; CÔRTEZ, L. M. C.; PEREIRA, B. A. S.; PASCARELLI, B. M. O.; CÔRTE-REAL, S.; FINKELSTEIN, L. C.; PINHO, R. T.; D'AVILA-LEVY, C. M. & ALVES, C. R.. Cysteine proteinases from promastigotes of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Parasitol Res**. 2009 (no prelo).
- REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B. & BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, **7**: 581–96. 2007.
- 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.
- RODRÍGUEZ, N. Factores de virulencia en *Leishmania* y su relación com el desarrollo de la leishmaniasis. **Dermatol Venezolana**, **41**: 3–9. 2003.
- SAKTHIANANDESWAREN, A.; FOOTE, S. T. & HANDMAN, E. The role of host genetics in Leishmaniasis. **Trends in Parasitol**, **25**: 383–391. 2009.
- SARMENTO, M. A. **Estudo da Resposta Microbicida de Macrófagos Peritoneais de Camundongo Durante a Interação com as Espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) shawi***. Trabalho de Conclusão de Curso. Belém. Universidade Federal do Pará. 2004.
- SILVA, N. S. & MUNIZ, V. D. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Acre, Amazônia brasileira. **Cad Saúde Pública**, **Rio de Janeiro**, **25**: 1325-1336. 2009.
- SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R. & CORBETT, C. 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**: 239-51. 2004.
- SOARES, M. J. Detecção de lipídios. In: **Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas**. Editor: Wanderley de Souza, 2ª Ed. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007. p.110-112.
- SOUZA, C. S. F.; MAIA, H.; CALABRESE, K. S.; ROSA, M. S. S.; CUPOLILO, S. M. N.; DA COSTA, S. C. G. & DO VALLE, T. Z.. As Leishmanioses. Departamento de protozoologia. **Fundação Oswaldo Cruz**, 1997.

- SPATH, G.F.; EPSTEIN, L.; LEADER, B.; SINGER, S.M.; AVILA, H.A.; TURCO, S.J. & BEVERLEY, S.M. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. **Proc Natl Acad Sci USA**, **97**: 9258–9263. 2000.
- SPICER, S. S.; HARDIN, J.H.; GREENE, W. B. Nuclear precipitates in pyroantimonate-osmium tetroxide-fixed tissues. **J Cell Biol**, **39**: 216–221. 1968.
- 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.
- TRIPATHI, A. & GUPTA C.M. Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania* promastigotas. **Mol Biochem Parasitol**, **128**: 1–9. 2003.
- VALE, E. C. S. & FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **An Bras Dermatol**, **80**: 421–428. 2005.
- VANNIER – SANTOS, M. A.; MARTINY, A. & DE SOUZA, W. Cell Biology of *Leishmania* spp.: Invading and Evading. **Curr Pharmac Design**, **8**: 297–318. 2002.
- VERCESI, A. E.; RODRIGUES, C. O.; CATISTIA, R. & DO CAMPO, R. Presence of a Na^+/H^+ exchanger in acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by anti-leishmanial drugs. **FEBS Letters**, **473**: 203–206. 2000.
- 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. **J of Immunol**, **176**: 1834–1839. 2006.
- WHO. World Health Organization (2009). Programmes and projects. Zoonoses and veterinary public health. Diseases information: Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.who.int/zoonoses/diseases/leishmaniasis/en/>. Último acesso em: 17/06/2009.
- 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.

9. ANEXO



SMC

Simpósio de Microscopia no Cerrado



Certificada

Certifico que HAGE, A. A. P.; RODRIGUES, A. P. D.; FARIAS, L. H. S.; SILVA, E. O. apresentaram o pôster intitulado "ULTRASTRUCTURAL CYTOCHEMISTRY ANALYSIS OF Leishmania (Viannia) braziliensis ISOLATED FROM DIFFERENT CLINICAL CASES" 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 Báp
Presidente do Comitê Organizador do SMC
Instituto de Ciências Biológicas - UNB