

MARLIANE BATISTA CAMPOS

ESTUDO IN VITRO DA INFECTIVIDADE DE ESPÉCIES DE
LEISHMANIA DO SUBGÊNERO VIANNIA EM MACRÓFAGOS
PERITONEAIS DE CAMUNDONGO BALB/c.

BELEM-PARÁ
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

MARLIANE BATISTA CAMPOS

**ESTUDO *IN VITRO* DA INFECTIVIDADE DE ESPÉCIES DE
LEISHMANIA DO SUBGÊNERO *VIANNIA* EM MACRÓFAGOS
PERITONEAIS DE CAMUNDONGO BALB/c.**

BELÉM-PARÁ
2003

616.9364
C1982
D15
24.1

MARLIANE BATISTA CAMPOS

**ESTUDO *IN VITRO* DA INFECTIVIDADE DE ESPÉCIES DE
LEISHMANIA DO SUBGÊNERO *VIANNIA* EM MACRÓFAGOS
PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/c.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Doenças Tropicais, área de concentração Patologia das Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Dr. Fernando Tobias Silveira

Co-orientadora: Dra. Claudia Gomes

**BELÉM-PARÁ
2003**

Campos, Marliane Batista

C198e Estudo *in vitro* da infectividade de espécies de *Leishmania*
do Subgênero *Viannia* em macrófagos peritoneais de camundongo
BALB/c / Marliane Batista Campos- Belém, 2003.
78fl., enc.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira

Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) –Núcleo de
Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará. 2003
Bibliografia: fl.64-78

1. *Leishmania*- Subgênero *Viannia*. 2. Camundongo
BALB/c. 3. Macrófagos peritoneais I. Título

CDD616.9364

MARLIANE BATISTA CAMPOS

**ESTUDO *IN VITRO* DA INFECTIVIDADE DE ESPÉCIES DE
LEISHMANIA DO SUBGÊNERO *VIANNIA* EM MACRÓFAGOS
PERITONEAIS DE CAMUNDONGO BALB/c.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Doenças Tropicais, área de concentração Patologia das Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Dr. Fernando Tobias Silveira
Co-orientadora: Dra. Claudia Gomes

BANCA EXAMINADORA

- 1- _____
Prof. Dra. Rita Catarina Monteiro
(Universidade Federal do Pará)
- 2- _____
Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado
(Universidade Federal do Pará)
- 3- _____
Prof. Dr. Ralph Lainson
(Instituto Evandro Chagas)

Julgado em: ____/____/____
Conceito: _____

BELEM-PARÁ

2003

“Existem homens que lutam um dia e são bons,
existem outros que lutam muitos dias e são melhores, porém
existem aqueles que lutam toda uma vida, esses são os imprescindíveis”

Bertold Brecht

A minha mãe, Rúbia Campos, a quem dedico as realizações
mais importantes da minha vida, pela constante dedicação
e inestimável apoio que tem estimulado
meu desenvolvimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir a existência da vida e por ter me tornado útil a humanidade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Silveira, que com êxito me fez descobrir e enveredar pela ciência, e que em sua sabedoria me transmitiu conhecimento e autoconfiança o que tem contribuído para o meu amadurecimento científico, humano e profissional. Serás sempre um grande exemplo a seguir, a você o meu muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Ralph Lainson, “mestre guru”, por quem tenho extrema admiração e respeito pela excelência de pesquisador e homem humilde que tão gentilmente me aceitou como orientanda no início dessa jornada quando várias portas se fecharam.

Ao Prof. Dr. Carlos Corbett que gentilmente abriu as portas de seu laboratório (LIM-50/FMUSP) para aprendizagem das técnicas laboratoriais utilizadas neste trabalho.

A minha co-orientadora Prof^a. Dra. Cláudia Gomes que com toda paciência e dedicação repassou-me as técnicas laboratoriais e por ter proporcionado oportunidades que contribuíram para a minha permanência por um ano no laboratório (LIM-50/FMUSP) que foi fundamental para o início deste trabalho, bem como pelo espírito crítico que muito enriqueceu nosso estudo. Muito obrigada amiga.

Ao Prof. Carlos e Prof. Dr. Hugo Pequeno chefe do Laboratório de Bioquímica/Hemocentro HC/FMUSP por permitir a realização das primeiras dosagem de NO em seu laboratório.

A querida Prof^a. Dra. Márcia Laurent (LIM-50/FMUSP) pelas grandes sugestões e o apoio na realização deste trabalho e pelo seu incentivo e carinho constantes.

Ao colega do laboratório de moléstias infecciosas e parasitárias LIM-50/FMUSP Francisco Aranha por repassar a técnica dos ensaios *in vitro*.

A secretária do LIM-50/FMUSP Lia Negrão, pela simpática pessoa e pela ajuda na aquisição de material científico.

Aos Diretores do Instituto Evandro Chagas, Dr. Jorge Fernando Soares Travassos da Rosa e Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro pela oportunidade do desenvolvimento do projeto nessa instituição de pesquisa.

Ao Dr. Adelson Souza, pelo estímulo e apoio sempre constante durante a realização deste trabalho.

À Dra. Edna Ishikawa, pelo incentivo e oportunidade do convívio profissional.

A equipe do Laboratório de Leishmaniose Nonato, Brandão, Martins, Aprígio, Carlos, Machado, Iorlando, Júlio, Negrão, Leonidas Graça, Rose, Zuíla e Domingas, não somente pela prontidão e colaboração técnica durante a realização deste trabalho, mas principalmente pela amizade que nasceu durante nosso convívio.

A amiga Yara Jennings que carinhosamente dispôs do seu tempo para me ajudar em alguns passos na finalização deste trabalho.

Aos colegas do curso de mestrado em especial ao Mauro Magno, Rozinéia, e Dr. Paulo Pimenta pelo companheiro.

As amigas Liliane, Khrisna e Roberta, aos mestrandos Dirceu e Simone e aos estagiários do Programa de Leishmanioses do IEC, Renata, Lucíola, Luciana, e Thiago pelo convívio profissional e pessoal sempre muito calorosos.

À Maria José Mateus, Nonato Santos, Joel Almeida e toda a equipe da Biblioteca do IEC que colaboraram na busca da informação bibliográfica.

A secretária da Parasitologia/Laboratório de Leishmaniose IEC Edna Maués pelo constante apoio emocional.

À Carolina Costa, Graça Silva, Adlai Sousa, Jedson, Augusto, Rodney e toda a equipe de Informática do IEC pelo auxílio na formatação deste trabalho.

Ao Diretor do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA, Prof. Dr. Luiz Carlos Silveira, e aos Coordenadores do Curso de Mestrado, Dra. Tereza Cristina Corvelo pelo apoio e incentivo à pós-graduação, e especialmente ao querido Prof. Dr. Habib Fraiha que com muita presteza sempre esteve disposto a me ajudar nas questões burocráticas durante o período que coordenou este o curso, e obrigada também pelo carinho que sempre recebi.

Ao Prof. Dr. José Luís Nascimento e Profa. Edilene por permitirem a continuação da realização da dosagem de NO em seus laboratórios e ao estagiário Marcos Sarmiento pela grande ajuda no processamento das amostras.

Ao meu pai Luiz Antônio, pelo incentivo na vida profissional e pelo carinho.

A minha amada mãezinha que tão cedo teve que se acostumar com minha ausência em casa, mas que nunca me fez desacreditar dos meus sonhos e seguir em busca dos meus ideais.

Aos meus queridos irmãos Jean, Kelly, Jailson e Carlinho que vêm na irmã mais velha a força de vencer.

À tia Nely (*in memória*) que nos deixou antes que eu terminasse mais essa etapa em minha vida. Tenho a certeza que vamos nos encontrar novamente e então vou te dizer, muito, muito obrigada tia por tudo.

Ao meu querido tio Idelvan, que sempre foi como um verdadeiro pai me ajudando nestes longos anos e sempre muito carinhoso.

Aos meus primos e filhinhos queridos Junior e Bárbara, pelo imenso carinho e confiança e pela compreensão nos momentos ausente por questão deste trabalho e mil desculpas pelos momentos de estresse.

A amiga Fernanda Moura, pela amizade e constante incentivo na minha vida profissional.

Aos camundongos que “deram” sua vida para realização deste trabalho.

A todos aqueles cujos nomes não foram citados, mas que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	HISTÓRICO.....	15
1.2	CONCEITO.....	17
1.3	ETIOLOGIA.....	18
1.3.1	A posição taxonômica do parasito.....	18
1.3.2	Espécies de <i>Leishmania</i> causadoras de LTA do Novo Mundo.....	18
1.4	BIOLOGIA.....	19
1.4.1	Ciclo evolutivo nos hospedeiros invertebrados.....	21
1.4.2	Ciclo evolutivo nos hospedeiro vertebrado.....	22
1.5	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	23
1.6	EPIDEMIOLOGIA.....	24
1.6.1	Incidência	24
1.6.2	Aspectos epidemiológicos da LTA com ênfase à região Amazônica	25
1.7	O SUBGÊNERO <i>Leishmania Viannia</i>	27
1.8	A CÉLULA HOSPEDEIRA.....	31
1.8.1	Interação parasito-célula hospedeira.....	34
1.8.2	Ação do sistema complemento.....	34
1.8.3	Adesão da <i>Leishmania</i> ao macrófago.....	35
1.8.4	Fagocitose e sobrevivência da <i>Leishmania</i>	36
1.9	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> COM <i>LEISHMANIA</i>	38
1.10	JUSTIFICATIVA	41
2	OBJETIVOS	42
2.1	GERAL.....	42

2.2	ESPECÍFICOS.....	42
3	MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1	Amostras de <i>Leishmania</i>	43
3.2	ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	43
3.3	MANUTENÇÃO DA VIRULÊNCIA DAS CEPAS DE <i>Leishmania</i>	45
3.4	ISOLAMENTO DO PARASITO EM <i>hamster (Mesocricetus auratus)</i>	45
3.5	CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO BALB/C..	46
3.6	INFECÇÃO DAS CULTURAS DE MACRÓFAGOS COM <i>Leishmania Viannia</i>	46
3.7	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE INFECÇÃO.....	46
3.8	QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	47
3.8.1	Determinação dos níveis de nitrito.....	47
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
3.10	ASPECTOS ÉTICOS.....	48
4	RESULTADOS.....	48
4.1	PORCENTAGEM DE MACRÓFAGOS INFECTADOS.....	48
4.2	NÚMERO DE PARASITOS POR MACRÓFAGOS INFECTADOS.....	49
4.3	ÍNDICE DE INFECÇÃO.....	52
4.4	QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	53
5	DISCUSSÃO.....	54
6	CONCLUSÕES.....	61
	APÊNDICE	62
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Formas evolutivas de *Leishmania*
- Figura 2- Ciclo biológico do parasito
- Figura 3- Distribuição geográfica mundial da leishmaniose tegumentar
- Figura 4- Esquema da reação de produção do óxido nítrico
- Figura 5- Porcentagem de macrófagos peritoneais de BALB/c infectados com espécies de *Leishmania (Viannia) sp*
- Figura 6- Número médio de parasitos por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com espécies de *Leishmania (Viannia) sp*
- Figura 7A- Paineis de fotomicrografias ilustrando a infecção *in vitro* de macrófagos Peritoneais de camundongos BALB/c com *Leishmania (Viannia) sp*
- Figura 7B- Paineis de microfotografia ilustrando a infecção *in vitro* de macrófagos Peritoneais de BALB/c *Leishmania (Viannia) sp*
- Figura 8- Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com espécies de *Leishmania (Viannia) sp*
- Figura 9- Níveis de NO (μM) nos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados com *Leishmania (Viannia) sp*

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
µg	micrograma
µl	microlitro
µm	micrômetro
g	grama
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetro
µg/µl	micrograma por microlito
Gp63	Glicoproteína 63
IFN-γ	Interferon gama
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolisacarídeo
NNN	Novy-Macneal-Nicolle
NO	Óxido nítrico
NO ₂	nitrito
SFB	Soro Bovino Fetal
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
C5b-9	Complexo de ataque a membrana
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
mM	Milimolar
nm	Nanômetro

RESUMO

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam variações de infectividade intra e inter específicas. Entretanto, são escassas as informações a respeito da infectividade das espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, principalmente, daquelas encontradas na região Amazônica brasileira, onde, até o presente momento são conhecidas seis espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* causadoras de LTA. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi investigar, *in vitro*, o comportamento da infectividade de 5 espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e sua correlação com a produção de óxido nítrico pelos macrófagos infectados. Trinta cepas de *Leishmania* foram distribuídas em seis grupos iguais, de acordo com as espécies seguintes: I- *L. (V.) braziliensis*/LCL, II-*L. (V.) braziliensis*/LCM, III- *L. (V.) guyanensis*, IV-*L. (V.) shawi*, V-*L. (V.) naiffi* e VI- *L. (V.) lainsoni*. As cepas foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de penicilina-gentamicina, até atingir a fase estacionária de cultivo, quando foram usadas para infectar macrófagos na proporção de 4 parasitos/macrófago. As culturas foram incubadas a 35°C e 5% de CO₂ e após 24h, as lamínulas foram coradas com Giemsa para contagem do número de parasitos e determinação do índice de infecção, enquanto a concentração de NO (nitrito) foi calculada pelo método de Griess. Observou-se que as cepas de *L. (V.) braziliensis*/LCM apresentaram o maior índice de infecção (385), sendo este significativamente maior ($p < 0,005$) que as cepas de *L. (V.) braziliensis*/LCL (264), *L. (V.) naiffi* (215) e *L. (V.) lainsoni* (272), porém, não significativamente maior que os índices das espécies *L. (V.) shawi* (292) e *L. (V.) guyanensis* (300). Quanto aos níveis de NO (nitrito), detectou-se maior concentração para a espécie *L. (V.) naiffi* (4,1μM) e menor concentração para as cepas de *L. (V.) braziliensis*/LCM (2,15μM). As demais espécies tiveram concentrações de: *L. (V.) lainsoni* (3,14μM), *L. (V.) shawi* (2,96μM), *L. (V.) guyanensis* (2,76μM) e cepas de *L. (V.) braziliensis*/LCL (3,1μM). Diante do exposto, concluímos que cepas de *L. (V.) braziliensis*/LCM são mais infectivas do que as demais espécies estudadas e, também, mais infectivas que cepas homólogas isoladas de casos clínicos de LCL. Além disso, observou-se menor infectividade da espécie *L. (V.) naiffi*. Desse modo, notou-se que os níveis de NO produzidos pelos macrófagos infectados foram inversamente proporcionais ao grau do parasitismo.

ABSTRACT

Parasites of the genus *Leishmania* show both intra- and inter-specific variations of infectivity. There is little available information, however, regarding the infective behavior of New World species particularly those of the Amazon Region of Brazil, where there occur at six species of the subgenus *Viannia* causing human cutaneous leishmaniasis (ACL). The aim of the present study was to investigate the infectivity of 5 of these species for the peritoneal macrophages of BALB/c mice, and their role in the host-cell's production of nitric oxide (NO). Thirty strains of *Leishmania* were divided into 6 groups of the following species: I-*L. (V.) braziliensis* (from cases of localized skin lesions-LCL); II- *L. (V.) braziliensis* (from cases of mucocutaneous lesions- LCM); III- *L. (V.) guyanensis*; IV- *L. (V.) shawi*; V- *L. (V.) naiffi* and VI- *L. (V.) lainsoni*. They were cultivated in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/gentamicin, until reaching the stationary phase of development. These promastigotes were used to infect the macrophage cell cultures, in the proportion of 4 flagellates/macrophage. The cultures were then incubated at 35°C with 5% CO₂ and, after 24 hours following inoculation, the corvelips were stained by Giemsa's method to determine the infection index. The nitric oxide (nitrite) concentration was measured in the culture supernatant by Griess's method to determine the infection index. The nitric oxide (nitrite) concentration was measured in the culture supernatant by Griess's method. It was found that LCM strains of *L. (V.) braziliensis* showed the highest infection index (385), significance $p < 0.05$, compared with *L. (V.) braziliensis* LCL strains (264). *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lansonii* had the lowest infection indices of (215) and (272), respectively, but, were not significantly different from index of *L. (V.) guyanensis* (300). Rrgarding the NO levels, the highest was that for *L. (V.) naiffi* (4,1µM), and the lowest for *L. (V.) braziliensis*-LCM strains (2,15µM). The other readings were (3,14µM) for *L. (V.) lainsoni*, 2,96µM for *L. (V.) shawi*, 2,76µM for *L. (V.) guyanensis* and 3,1µM for *L. (V.) braziliensis*-LCL strains. It is concluded that *L. (V.) naiffi*. In this way it may be noted the NO levels for infected macrophage were inversely proportional to the degree of infectivity of the species studied.

ABSTRACT

Parasites of the genus *Leishmania* show both intra- and inter-specific variations of infectivity. There is little available information, however, regarding the infective behavior of New World species particularly those of the Amazon Region of Brazil, where there occur at six species of the subgenus *Viannia* causing human cutaneous leishmaniasis (ACL). The aim of the present study was to investigate the infectivity of 5 of these species for the peritoneal macrophages of BALB/c mice, and their role in the host-cell's production of nitric oxide (NO). Thirty strains of *Leishmania* were divided into 6 groups of the following species: I-*L. (V.) braziliensis* (from cases of localized skin lesions-LCL); II- *L. (V.) braziliensis* (from cases of mucocutaneous lesions- LCM); III- *L. (V.) guyanensis*; IV- *L. (V.) shawi*; V- *L. (V.) naiffi* and VI- *L. (V.) lainsoni*. They were cultivated in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/gentamicin, until reaching the stationary phase of development. These promastigotes were used to infect the macrophage cell cultures, in the proportion of 4 flagellates/macrophage. The cultures were then incubated at 35°C with 5% CO₂ and, after 24 hours following inoculation, the corvelips were stained by Giemsa's method to determine the infection index. The nitric oxide (nitrite) concentration was measured in the culture supernatant by Griess's method to determine the infection index. The nitric oxide (nitrite) concentration was measured in the culture supernatant by Griess's method. It was found that LCM strains of *L. (V.) braziliensis* showed the highest infection index (385), significance $p < 0.05$, compared with *L. (V.) braziliensis* LCL strains (264). *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lainsoni* had the lowest infection indices of (215) and (272), respectively, but, were not significantly different from index of *L. (V.) guyanensis* (300). Rrgarding the NO levels, the highest was that for *L. (V.) naiffi* (4,1µM), and the lowest for *L. (V.) braziliensis*-LCM strains (2,15µM). The other readings were (3,14µM) for *L. (V.) lainsoni*, 2,96µM for *L. (V.) shawi*, 2,76µM for *L. (V.) guyanensis* and 3,1µM for *L. (V.) braziliensis*-LCL strains. It is concluded that *L. (V.) naiffi*. In this way it may be noted the NO levels for infected macrophage were inversely proportional to the degree of infectivity of the species studied.

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

A leishmaniose figura entre as enfermidades que vem afligindo o homem desde a antiguidade. Há relatos na literatura sobre leishmaniose tegumentar do primeiro século d.C., na Ásia Central, na região Norte do Afeganistão, onde a doença era referida como “úlceras de Balkh” (Lainson, 1996b). No Novo Mundo, um dos primeiros registros de uma forma clínica similar à leishmaniose foi encontrada em cerâmicas da época pré-colombiana (400-900 anos d.C.), onde índios peruanos tentavam transcrever em *huacos* faces humanas com mutilações do nariz e dos lábios, muito semelhantes às encontradas na leishmaniose mucocutânea (Lainson, 1997a).

A descoberta dos agentes etiológicos da leishmaniose, entretanto só teve início no final do século XIX, quando Cunningham (1885), na Índia, observou formas amastigotas em um caso de “calazar”. Posteriormente, na Rússia, Borovsky (1898) demonstrou ser um protozoário o agente etiológico do “botão do oriente”, sem lhe dar nome, contudo.

Foi na Índia, em 1901, que William Leishman identificou o organismo responsável pela doença através de raspas das bordas de úlceras de um paciente com “febre dum-dum” ou kala-azar. Dois anos mais tarde, Donovan descreveu estes organismos como novas e distintas formas de tripanossomas e Ronald Ross (1903) relacionou estes organismos ao calazar, e os classificou no gênero *Leishmania* (WHO, 1998).

Nas Américas, a natureza leishmaniótica das lesões cutâneas e nasofaríngeas só foi confirmada pela primeira vez, em 1909, por Adolfo Lindenberg, quando comunicou o encontro do parasito na “úlceras de Bauru”, sendo este achado confirmado no mesmo ano por Carini e Paranhos (1909).

Até 1911 pensava-se que *Leishmania tropica*, agente etiológico da leishmaniose cutânea do Velho Mundo, fosse também responsável pela enfermidade no Novo Mundo. Entretanto, Gaspar Vianna (1911) observando que o parasito apresentava características morfológicas que o diferenciava da *Leishmania tropica* deu ao parasito o nome de *Leishmania brasilienses*. Mais tarde, em 1916, Matta renomeou a espécie para *Leishmania braziliensis*. A partir de então, ficou caracterizada a etiologia da enfermidade referida como “ferida brava”, “nariz de anta”, “úlcera de Baurú”, “úlcera do oriente”, “botão da Bahia”, entre outros (Silveira *et al.*, 1997).

Em continuidade aos estudos sobre a enfermidade, passou-se a questionar o modo de transmissão da doença. No século XVIII, médicos asiáticos indicavam que a picada de insetos era a causa da ferida oriental (Lainson, 1997a). A confirmação, porém, só veio mais tarde, em 1921 em Biskra, na África do Norte, quando Sergent e cols infectaram a espécie de flebotomíneo *Phlebotomus papatasi* com o protozoário (Shortt *et al.* 1926,). Os insetos eram alimentados em voluntários que manifestavam, pouco tempo depois, as lesões leishmanióticas. No Novo Mundo, a primeira prova conclusiva da transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) por picada de insetos flebotomíneos foi obtida por Strangways-Dixon e Lainson (1962), quando estudavam a epidemiologia da úlcera dos chicleros, nas florestas de Belize, Honduras Britânica, conseguiram transmitir a *Leishmania mexicana* a um voluntário através de um flebotomíneo experimentalmente infectado.

Com a descoberta de animais silvestres e de cães como reservatórios da leishmaniose, evidenciou-se o caráter zoonótico da doença (Lainson, 1996b), o que proporcionou o conhecimento de que a moléstia adotava características peculiares em vários lugares, com grande variabilidade do quadro clínico, apresentando desde casos benignos com manifestações simples e transitórios a casos graves com extensas lesões (Marsden, 1979; 1982).

Até 1911 pensava-se que *Leishmania tropica*, agente etiológico da leishmaniose cutânea do Velho Mundo, fosse também responsável pela enfermidade no Novo Mundo. Entretanto, Gaspar Vianna (1911) observando que o parasito apresentava características morfológicas que o diferenciava da *Leishmania tropica* deu ao parasito o nome de *Leishmania brasilienses*. Mais tarde, em 1916, Matta renomeou a espécie para *Leishmania braziliensis*. A partir de então, ficou caracterizada a etiologia da enfermidade referida como “ferida brava”, “nariz de anta”, “úlcera de Baurú”, “úlcera do oriente”, “botão da Bahia”, entre outros (Silveira *et al.*, 1997).

Em continuidade aos estudos sobre a enfermidade, passou-se a questionar o modo de transmissão da doença. No século XVIII, médicos asiáticos indicavam que a picada de insetos era a causa da ferida oriental (Lainson, 1997a). A confirmação, porém, só veio mais tarde, em 1921 em Biskra, na África do Norte, quando Sergent e cols infectaram a espécie de flebotomíneo *Phlebotomus papatasi* com o protozoário (Shortt *et al.* 1926,). Os insetos eram alimentados em voluntários que manifestavam, pouco tempo depois, as lesões leishmanióticas. No Novo Mundo, a primeira prova conclusiva da transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) por picada de insetos flebotomíneos foi obtida por Strangways-Dixon e Lainson (1962), quando estudavam a epidemiologia da úlcera dos chicleros, nas florestas de Belize, Honduras Britânica, conseguiram transmitir a *Leishmania mexicana* a um voluntário através de um flebotomíneo experimentalmente infectado.

Com a descoberta de animais silvestres e de cães como reservatórios da leishmaniose, evidenciou-se o caráter zoonótico da doença (Lainson, 1996b), o que proporcionou o conhecimento de que a moléstia adotava características peculiares em vários lugares, com grande variabilidade do quadro clínico, apresentando desde casos benignos com manifestações simples e transitórios a casos graves com extensas lesões (Marsden, 1979; 1982).

1.2 CONCEITO

A LTA é uma doença infecciosa crônica causada por protozoários do gênero *Leishmania* determinando no homem um vasto leque espectral de manifestações as quais variam desde da forma cutâneo-mucosa hiper reativa (LCM) até a forma cutânea anérgica difusa (LCAD), constituindo as formas polares da doença. Como formas intermediárias encontram-se a forma cutânea localizada normoreativa (LCL) e a forma intermediária, cutânea disseminada borderline (LCDB) hiporeativa reversível (Silveira, 2001). A infecção caracteriza-se por comprometer o tecido cutâneo originando lesões cutâneas única, múltiplas, disseminadas e/ou com envolvimento mucoso, dependendo da espécie de parasito envolvido e da resposta imunológica do hospedeiro.

A úlcera leishmaniótica é a manifestação cutânea mais comum e tem como características contornos circulares, bordas elevadas e infiltradas, fundo granuloso e, quase sempre, recoberto com discreto exsudato.

O comprometimento mucoso pode surgir meses ou anos após a cicatrização da lesão de pele inicial, a qual pode sofrer metástase e disseminar por via hematogênica atingindo o tecido mucoso nasobucofaríngeo, caracterizando a leishmaniose cutâneo-mucosa ou simplesmente mucosa (Rey, 2001).

Normalmente não há comprometimento dos órgãos internos na LTA, porém há autores que já relataram casos de pacientes imunocomprometidos portadores de LTA com comprometimento de órgãos internos (Ali, A., 2002; Guiguemde *et al.*, 2003).

1.3 ETIOLOGIA

1.3.1 A posição taxonômica do parasito

O parasito ocupa a seguinte posição taxonômica:

Reino PROTISTA Haeckel 1866

Sub-Reino PROTOZOA Goldfuss 1817

Filum SARCOMASTIGOPHORA Honigberg e Balamuth 1963

Sub-Filum MASTIGOPHORA Deising 1866

Classe ZOOMASTIGOPHOREA Calkins 1909

Ordem KINETOPLASTIDA Honigberg 1963, emend. Vickerman 1976

Sub-ordem TRYPANOSOMATINA Kent 1880

Família TRYPANOSOMATIDAE Doflein 1901, emend. Grobben 1905

Gênero *Leishmania* Ross 1903

1.3.2 Espécies de *Leishmania* causadoras de LTA do Novo Mundo

As leishmanias são classificadas de acordo com critérios morfológicos, biológicos, genéticos, bioquímicos e imunológicos, aliados às observações da distribuição geográfica, além do comportamento dos parasitos no hospedeiro vertebrado e invertebrado. Baseados nestes critérios Lainson & Shaw (1987) propuseram uma classificação do gênero *Leishmania* em dois subgêneros de acordo com o desenvolvimento do parasito no tubo digestivo do inseto vetor. Sendo assim, espécies de *Leishmania* cujo ciclo no vetor está restrito à porção anterior e média do tubo digestivo pertencem ao subgênero *Leishmania* e aquelas espécies que apresentam fase profícuca e prolongada de desenvolvimento de promastigotas aderidos por hemidesmossomas flagelares à parede do piloro e íleo, com posterior migração para o intestino médio e anterior do inseto são classificadas no subgênero *Viannia*.

Atualmente, são conhecidas cerca de 31 espécies de *Leishmania* no mundo inteiro, das quais 22 são encontradas no Novo Mundo, sendo apenas 13 incriminadas como agentes etiológicos de LTA, e destas, 7 espécies tem registro na região Amazônica como causadoras da doença (tabela 1) (Lainson, 1997a).

Tabela 1- Espécies de *Leishmania* conhecidas no Novo Mundo.

Subgênero <i>Leishmania</i> Ross, 1903	Subgênero <i>Viannia</i> Lainson & Shaw 1987
<i>Leishmania</i> (L.) <i>enriettii</i> Muniz & Medina, 1948	<i>Leishmania</i> (V.) <i>braziliensis</i> Vianna, 1911 emend. Matta, 1916* ♦
<i>Leishmania</i> (L.) <i>hertigi</i> Herrero, 1971	<i>Leishmania</i> (V.) <i>panamensis</i> Lainson & Shaw, 1972 ♦
<i>Leishmania</i> (L.) <i>mexicana</i> Biagi, 1953 emend. Garnham, 1962 ♦	<i>Leishmania</i> (V.) <i>peruviana</i> Vélez, 1913 ♦
<i>Leishmania</i> (L.) <i>pifanoi</i> Medina & Romero, 1959 emend. Medina & Romero, 1962 ♦	<i>Leishmania</i> (V.) <i>guyanensis</i> Floch, 1954* ♦
<i>Leishmania</i> (L.) <i>amazonensis</i> Lainson & Shaw, 1972* ♦	<i>Leishmania</i> (V.) <i>lainsoni</i> Silveira et al., 1987* ♦
<i>Leishmania</i> (L.) <i>deanei</i> Lainson & Shaw, 1977	<i>Leishmania</i> (V.) <i>naiffi</i> Lainson & Shaw, 1989* ♦
<i>Leishmania</i> (L.) <i>garnhami</i> Scorza et al., 1979	<i>Leishmania</i> (V.) <i>shawii</i> Lainson et al., 1989* ♦
<i>Leishmania</i> (L.) <i>forattinii</i> Yoshida et al., 1993	<i>Leishmania</i> (V.) <i>equatoriensis</i> Grimaldi et al., 1992
<i>Leishmania</i> (L.) <i>aristidesi</i> Lainson & Shaw, 1979 emend. Lainson & Shaw, 1987	<i>Leishmania</i> (V.) <i>colombiensis</i> Kreutzer et al., 1991 ♦
<i>Leishmania</i> (L.) <i>venezuelensis</i> Bonfante-Garrido, 1980 ♦	<i>Leishmania</i> (V.) <i>lindenbergi</i> Silveira et al., 2002* ♦
<i>Leishmania</i> (L.) <i>chagasi</i> Cunha e Chagas, 1937	<i>Leishmania</i> (V.) <i>utingensis</i> Braga et al., 2003

♦ Espécies conhecidas como causadoras de LTA humana

*Espécies dermatrópicas encontradas no Estado do Pará, região Amazônica do Brasil.

1.4 BIOLOGIA

Os parasitos do gênero *Leishmania* compreendem espécies de protozoários digenéticos, que caracterizam-se por apresentar duas formas evolutivas distintas: (1) forma

amastigota, tipicamente ovóide medindo cerca de 2,5 a 5 μm de comprimento por 1,5 a 3 μm de largura, encontrada como parasito intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear (principalmente em macrófagos) dos hospedeiros vertebrados; (2) forma promastigota, apresenta flagelo livre, corpo fusiforme medindo em torno de 10 μm de comprimento por 2,5 de largura, é encontrada naturalmente no trato digestivo do hospedeiro invertebrado, podendo também ser observada em meio de cultura. Ambas as formas se reproduzem de forma assexuada por divisão binária (Lainson e Shaw, 1992).

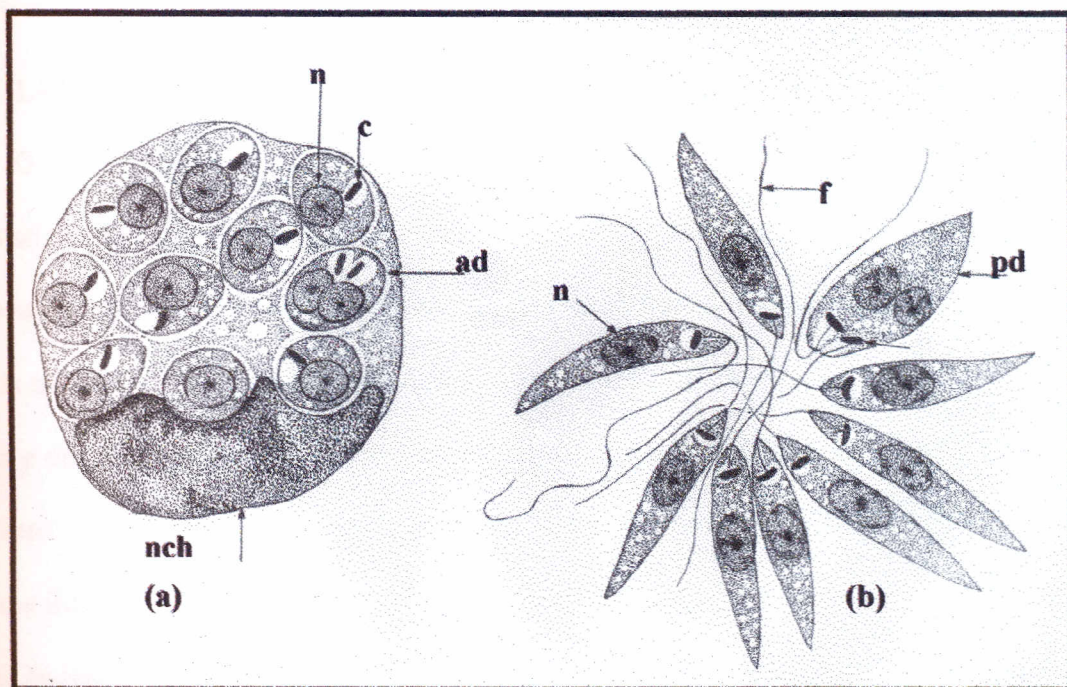


Figura 1- Formas evolutivas de *Leishmania*:

(a) Amastigotas no macrófago do hospedeiro mamífero, (b) promastigotas no vetor flebotomíneo (Lainson, 1982). ad = amastigota em divisão; pd = promastigota em divisão; c = cinetoplasto; f = flagelo; n = núcleo; nch = núcleo da célula hospedeira.

A leishmaniose tegumentar americana é considerada uma zoonose de animais silvestres, cuja transmissão se dá através da picada de insetos vetores flebotomíneos dos gêneros *Psychodopygus* e *Lutzomyia* aos seus hospedeiros naturais. Nestes a infecção é

usualmente inaparente indicando um relacionamento bem equilibrado entre o parasito e o animal, ao contrário do que se observa no homem onde a infecção geralmente evolui para doença (Lainson & Shaw, 1987; 1992).

O ciclo evolutivo das espécies do gênero *Leishmania* é do tipo heteroxênico (Fig.2), compreendendo uma fase evolutiva no hospedeiro invertebrado que alberga as formas promastigotas e paramastigotas, e outra fase nos hospedeiros vertebrados, que inclui grande variedade de mamíferos, nos quais a forma amastigota vive e multiplica-se no interior dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos.

1.4.1 Ciclo evolutivo nos hospedeiros invertebrados

O ciclo biológico no hospedeiro invertebrado ocorre quando a fêmea dos flebotomíneos pica um vertebrado infectado durante o repasto sanguíneo e ingere juntamente com o sangue macrófagos parasitados por formas amastigotas. No tubo digestivo dos insetos, a forma amastigota modifica-se e assume a forma promastigota, que se multiplica por divisão binária e dependendo da espécie do parasito segue caminhos diferentes. Assim, espécies do subgênero *Viannia* dirigem-se para o intestino posterior, onde colonizam a região peripilária (piloro e íleo) transformando-se em formas paramastigotas, que aderem ao epitélio intestinal através de hemidesmossomas e em seguida, voltam à forma promastigota infectante e migram em direção à proboscita. Quanto às formas promastigotas das espécies do subgênero *Leishmania*, estas multiplicam-se livremente ou aderem à parede do estômago (região suprapilária). Em seguida, ocorre migração destes flagelados para região anterior colonizando o esôfago e a faringe, onde se diferenciam em promastigotas metacíclicas infectantes e migram em direção à proboscita estando aptas a infectar outro hospedeiro (Lainson & Shaw, 1987; Lainson, 1997a).

1.4.2 Ciclo evolutivo nos hospedeiros vertebrados

A infecção no hospedeiro vertebrado se estabelece no momento em que a fêmea infectada, ao realizar o repasto sanguíneo inocula as formas promastigotas no local da picada. Os parasitos na forma promastigota são interiorizados pelos macrófagos teciduais, indo alojar-se no interior de vacúolos parasitóforos para em seguida transformar-se em amastigotas. Estes, já adaptados ao novo meio fisiológico, resistem à ação destruidora de enzimas lisossomais, multiplicando-se por divisão binária até ocupar todo o citoplasma. A infecção é mantida pelo rompimento da célula infectada, causado pela intensa multiplicação desses parasitos que, após liberação, são novamente fagocitados por outros macrófagos reiniciando um novo ciclo.

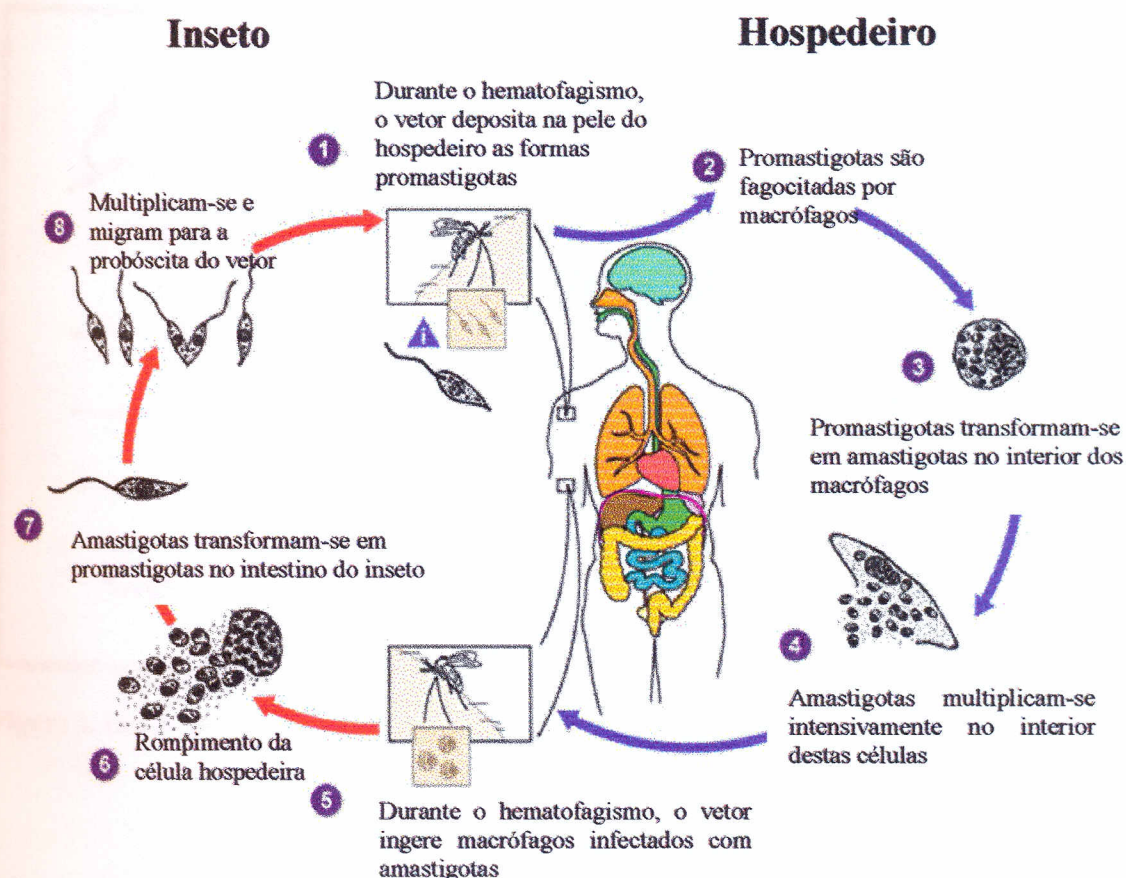


Figura 2- Ciclo biológico do parasito

Fonte: adaptado de www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/leishmaniasis.htm

1.5 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A leishmaniose tegumentar tem ampla distribuição geográfica, sendo registrada no Velho Mundo no litoral da Bacia do Mediterrâneo, Sudão e parte Oriental da África, no Oriente Médio e parte da China (Lainson, 1997a).

Nas Américas, a LTA tem sido assinalada numa extensa área geográfica, ocorrendo desde a fronteira do Texas, entre Estados Unidos e México, até o Norte da Argentina, não havendo relato desta protozoose no Canadá, Chile e Uruguai. No Brasil, a LTA encontra-se distribuída em uma grande área endêmica já tendo sido confirmada em todos os Estados brasileiros (Desjeux, 1996; Lainson, 1997a; FUNASA, 2000).

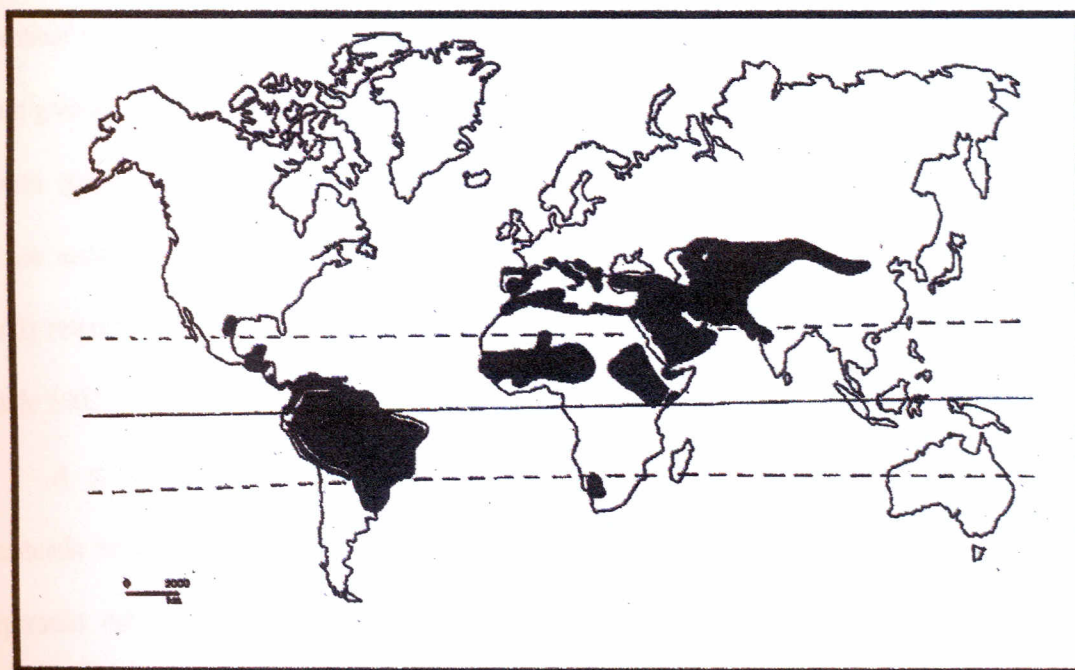


Figura 3. Distribuição geográfica da leishmaniose tegumentar segundo Lainson, 1997a.

1.6 EPIDEMIOLOGIA

1.6.1 Incidência

A leishmaniose tegumentar americana é uma enzootia de animais silvestres. A transmissão ao homem acontece quando este adentra em áreas de matas primárias passando a ter um caráter zoonótico.

No Brasil, sua importância deve-se tanto pela ampla expansão geográfica quanto pela magnitude da doença, uma vez que é capaz de produzir no homem deformidades físicas, que acabam por afetá-lo psicologicamente e comprometendo-o ao nível sócio-econômico.

Apesar do reconhecimento da existência da doença em grande parte da população, determinar a incidência real da infecção é muito difícil, devido a alguns motivos: a existência de um grande número de doentes sem acesso ao sistema de saúde, a subnotificação, e ainda, doentes que apresentam infecções sub-clínicas (Desjeux, 1992; Falqueto & Sessa, 1997). Mesmo assim, dados do Boletim Estatístico da Secretaria de Vigilância de Saúde (SVS), (2002) relataram 30.087 casos de leishmaniose tegumentar em todo território brasileiro, no ano de 2002.

A moléstia tem sido assinalada em todo território nacional, tendo, porém, uma acentuada notificação nas regiões Centro-Oeste, Nordeste e Norte. Nesta última, ocorre a expressão máxima da doença perfazendo um total de 10.809 casos notificados, o que corresponde a 36% do total da casuística nacional.

No tocante ao Estado do Pará, de acordo com o Boletim estatístico do Sistema de Vigilância em Saúde, entre os anos de 1991 a 2002, foram registrados cerca de 10.809 casos de LTA, sendo que 4.359 foram detectados em 2002 (Boletim estatístico do SVS, 2002). Esses dados reforçam o interesse e a importância do estudo dessa moléstia em nosso Estado, uma vez que, aliado ao fato de que nossa região alberga uma variedade importante de espécies de *Leishmania* causadoras de LTA.

1.6.2 Aspectos eco-epidemiológicos da LTA com ênfase à região Amazônica

Embora as espécies de *Leishmania* tenham ecologia e distribuição geográfica próprias, as doenças por elas produzidas são essencialmente zoonoses transmitidas ao homem por fêmeas adultas de espécies de flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia* e *Psychodopygus*, no Novo Mundo (Lainson & Shaw, 1992; Lainson *et al.*, 1994).

Nas Américas, são conhecidas mais de 350 espécies dos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus*, mas somente 32 delas têm sido implicadas como vetores da leishmaniose (Grimaldi & Tesh, 1993). Desse total, 330 espécies ocorrem no Brasil, sendo 122 espécies na Região Amazônica, das quais 25% são antropófagas (Lainson & Shaw, 1992). Dessa forma, vale a pena ressaltar as espécies vetoras desta região que merecem destaque, tais como: *Psychodopygus ayrozai* (Barreto & Coutinho, 1940); *Psychodopygus wellcomei* (Frahia, Shaw & Lainson, 1971), *Psychodopygus paraensis* (Costa Lima, 1941), *Lutzomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), *Lutzomyia flaviscutellata*, (Mangabeira, 1942), *Lutzomyia anduzei* (Rozeboom, 1942), *Lutzomyia umbratilis* (Ward & Fraiha, 1977), e *Psychodopygus complexus* (Mangabeira, 1941) (Lainson & Shaw; Young & Duncan, 1994; De Souza *et al.*, 1996).

Na região Amazônica, um grande número de animais atuam como hospedeiros vertebrados da doença. Dentre as espécies registradas como reservatórios mamíferos das várias espécies de *Leishmania*, destacam-se, entre outros, roedores, marsupiais, preguiças, tatus, tamanduás, raposas e primatas, encontrados especialmente nas florestas primárias e bosques (Lainson & Shaw, 1979; Lainson, 1997a). Neste cenário epidemiológico observamos também uma multiplicidade de espécies de *Leishmania* capazes de infectar o homem, que juntamente com os flebotomíneos vetores e os reservatórios silvestres estabelecem a tríade epidemiológica compondo diferentes ciclos de transmissão. Assim, as características eco-epidemiológicas peculiares da LTA associadas aos seus agentes etiológicos devem-se às

barreiras ambientais próprias do hospedeiro que limitam cada espécie de *Leishmania* a um vetor específico, assim como ao reservatório (Lainson *et al.*, 1994).

A relação existente entre mamíferos e flebotomíneos em nichos ecológicos específicos é condicionada por diversos fatores ambientais e por ações diversas do homem, uma vez que deslocamentos demográficos descontrolados para novas áreas agrícolas, a invasão extensiva das florestas e as manobras militares têm produzido modificações ecológicas com repercussão direta na epidemiologia e no impacto da LTA (Grimaldi *et al.*, 1989; Lainson, *et al.*, 1994). Essa influência do ambiente tão desgastado na manutenção da transmissão, não só da leishmaniose, como de diversas doenças, tem sido amplamente difundida na literatura médica, não deixando dúvidas de que as alterações do meio, provocadas pelo homem, que também passa a ser a maior vítima de sua própria ação, têm modificado o perfil epidemiológico das leishmanioses em determinadas áreas onde a transmissão estava relacionada primariamente a animais silvestres (Lainson & Shaw, 1978; Lainson, 1981; Marzochi & Marzochi, 1994).

Nesse contexto, vale a pena ressaltar que no Brasil a doença apresenta dois perfis epidemiológicos distintos de acordo com o modo de transmissão; silvestre-florestal e periurbano (Lainson *et al.*, 1994; Silveira *et al.*, 1997).

O primeiro ocorre quando o homem adentra as áreas de matas e passa a ter contato com os focos zoonóticos. É característico da região Amazônica, estando associado com a construção de novas estradas que cortam áreas de florestas primárias, ou com o desmatamento relacionado à silvicultura, agricultura, ou de implantação de projetos agropecuários, instalação de povoados em regiões pioneiras, e outras atividades sociais que revelam o caráter ocupacional da doença. Com relação ao segundo perfil, ocorre em áreas de colonização antiga, estando relacionada a fluxos migratórios, ocupação de encostas e aglomerados semiurbanos na periferia de centros urbanos. Neste padrão, animais domésticos como o cão, equínos e roedores, parecem ter papel importante como reservatório do parasito.

1.7 O SUBGÊNERO *Leishmania Viannia*

As espécies do subgênero *Viannia* são autóctones das Américas, a maioria mais precisamente da região Amazônica, onde, só no Brasil, são registradas seis espécies de interesse médico incriminadas como agentes etiológicos de LTA, todas com registro no Estado do Pará. Encontram-se distribuídas em situações epidemiológicas bem heterogêneas e peculiares, sendo mantidas em suas respectivas cadeias epidemiológicas, juntamente com seus vetores e hospedeiros, tabela 2 (Lainson *et al.*, 1994; Silveira *et al.*, 2002).

Tabela 2-Espécies de *Leishmania (Viannia)* causadoras de LTA no Brasil, e seus respectivos vetores e reservatórios na região Amazônica.

Vetor	Agente etiológico	Reservatório
<i>Ps. complexus</i> <i>Ps. wellcomei</i>	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	?
<i>Lu. umbratilis</i>	<i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	<i>Choloepus didactylus</i> <i>Didelphis sp</i> <i>Tamandua tetradactylus</i>
<i>Lu. whitmani</i>	<i>Leishmania (V.) shawi</i>	<i>Cebus apella</i> <i>Chiropotes satamus</i> <i>Choloepus didactylus</i> <i>Bradypus tridactylus</i> <i>Nasua nasua</i>
<i>Ps. ayrozai</i> <i>Ps. paraensis</i> <i>Ps. squamiventris</i>	<i>Leishmania (V.) naiffi</i>	<i>Dasypus novemcinctus</i>
<i>Lu. ubiquitalis</i>	<i>Leishmania (V.) lainsoni</i>	<i>Agouti paca</i>
<i>Lu. antunesi</i> (possível)	<i>Leishmania (V.) lindenbergi</i>	?

Fonte: Lainson *et al.*, 1994.

O subgênero *Viannia* compreende parasitos dermatrópicos de animais silvestres, sendo o homem um hospedeiro acidental. Nos reservatórios naturais, os parasitos induzem lesões

cutâneas discretas ou inconspícuas. No homem, as lesões cutâneas únicas ou múltiplas são frequentemente extensas e desfigurantes podendo ou não ter envolvimento mucoso.

Algumas espécies desse subgênero são consideradas responsáveis pela forma mais severa da doença em humanos e formam o chamado complexo *braziliensis*, ou seja: *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (V.) panamensis*. Na região Amazônica, como referido anteriormente, as seis espécies deste subgênero estão associadas à doença no homem.

A espécie *L. (V.) braziliensis*, apresenta ampla distribuição geográfica, sendo notificada em vários estados brasileiros, inclusive no Estado do Pará, onde apresenta-se como a espécie mais frequente associada à leishmaniose cutânea localizada e cutâneo-mucosa, visto a elevada antropofilia dos seus vetores *Psychodopygus complexus*, em Paragominas, e *Psychodopygus wellcomei*, na Serra dos Carajás, Estado do Pará. No homem, causa lesões conhecidas como “ferida brava”, “ulcera de Bauru”, “nariz de anta” dentre outros (Lainson & Shaw, 1987; 1998). Quanto aos reservatórios naturais do parasito muito pouco é sabido a respeito (Lainson, 1997a). Um aspecto importante em relação a essa espécie é que ainda não se conseguiu identificar, definitivamente, o animal reservatório desta dessa espécie, apesar de alguns pesquisadores suspeitarem de que roedores como *Rattus rattus* (rato-preto) e *Bolomys lasiurus* (rato do mato) funcionem como reservatórios deste parasito (Brandão & Shaw, 2003).

De todas as espécies de parasitos causadores de leishmaniose tegumentar do subgênero *Viannia* esta é a mais preocupante, por ser responsável por uma forma mais grave da doença (forma mucosa), já que, enquanto as lesões cutâneas podem curar-se espontaneamente ou respondem bem a quimioterapia, as lesões mucosas são frequentemente destrutivas e comumente refratárias ao tratamento com o uso dos medicamentos recomendados pela OMS, Glucantime, Pentamidina entre outros (Carvalho *et al.*, 1994). Esta forma, na maioria das

vezes é secundária às lesões cutâneas, surgindo geralmente, meses ou anos após o aparecimento da lesão de pele inicial causada pela *L (V.) braziliensis* sem nenhum tipo de tratamento específico (Marsden 1986; Marsden *et al.*, 1984). Ressalta-se também a grande importância desta espécie pela dificuldade que se tem em estabelecer um diagnóstico parasitológico, uma vez que as formas amastigotas são escassas na lesão e também por esta espécie apresentar um difícil isolamento em meio de cultivo (Piñero *et al.*, 1999).

Quanto à *Leishmania (V.) guyanensis*, no Brasil encontra-se distribuída em toda calha norte do rio Amazonas, nos Estados do Pará, Amapá, Amazonas, e Roraima. É agente causal de leishmaniose cutânea localizada conhecida como “pian bois”.

Entre os animais silvestres, os reservatórios principais são a “preguiça real”, *Choloepus didactylus*, o tamanduá *Tamandua tetradactylus* e a “mucura” *Didelphis* sendo que a última parece funcionar como reservatório secundário. Esta espécie de *Leishmania* tem como principal vetor o flebotomíneo *Lutzomyia umbratilis*, que tem por hábito o ataque em grande número, resultando em múltiplas lesões cutâneas e também lesões metastáticas através dos linfáticos (Lainson & Shaw, 1992).

Há relatos, no entanto, de casos de envolvimento mucoso com esta espécie, sendo, este tipo de manifestação extremamente raro (Naiff *et al.*, 1998, 1991; Santrich *et al.*, 1988; Lainson, *et al.*, 1994;), em comparação com a frequência da forma mucosa causada por *Leishmania (V.) braziliensis* (Marsden, 1986).

Outra espécie pertencente a este subgênero como agente causal de LTA é a *Leishmania (V.) shawi* (Lainson & Shaw, 1998). Ocorre principalmente, nas regiões nordeste e sudeste do Estado do Pará e na Amazônia maranhense. Geralmente causa lesões cutâneas simples, mas foram também observados casos de infecção com múltiplas lesões ulceradas e nodulares (Lainson & Shaw, 1992). Essa espécie tem como hospedeiros mamíferos macacos *Cebus apella* e *Chiropotes satanas*; as preguiças *Choloepus didactylus* e *Bradypus*

tridactylus; o quati *Nasua nasua* e, acidentalmente, o homem quando adentra em áreas de florestas primárias e entra em contato com o vetor transmissor do parasito *Lutzomyia whitmani* (Silveira *et al.*, 1997a).

Em 1979 Lainson *et al.* (1979) isolaram do tatu, *Dasypus novemcinctus*, um outro parasito do subgênero *Viannia*, que somente dez anos após sua descoberta foi nomeado como *Leishmania (V.) naiffi* (Lainson *et al.*, 1989). Embora a distribuição geográfica desta espécie ainda seja pouco conhecida, casos de leishmaniose cutânea por esta espécie já foram registrados no Estado do Pará e Amazonas. Os vetores flebotomíneos transmissores deste parasito são: *Ps. ayrozai*, *Ps. paraensis* (Arias *et al.*, 1985) e *Ps. squamiventris* (Naiff *et al.*, 1991), todos altamente antropofílicos e sendo a infecção em humanos mais comum do que se havia imaginado (Lainson *et al.*, 1990).

A *L. (V.) lainsoni* foi isolada pela primeira vez relacionando-a com casos humanos em 1987 no município de Benevides, Pará (Silveira *et al.*, 1987). Tem como reservatório o roedor *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae), um mamífero silvestre de grande importância na manutenção desta *Leishmania* (Silveira *et al.*, 1991). O vetor incriminado como transmissor é o *Lutzomyia ubiquitalis*, uma espécie de flebotomíneo de baixa antropofilia, daí a infecção humana ser menos freqüente comparada com as infecções causadas pelas espécies descritas acima. Mais recentemente alguns casos humanos têm sido notificados por esta espécie no Peru (Lucas, *et al.*, 1994; 1998) e na Bolívia (Martinez *et al.*, 2001) com manifestações clínicas que não fogem aos padrões da leishmaniose cutânea.

Com relação à *L. (V.) lindenbergi*, é uma espécie dermatrópica descrita recentemente por Silveira *et al.* (2002), com ocorrência no Estado do Pará. Está associada à leishmaniose cutânea localizada e, até momento, ainda não se conhece os animais que atuam como reservatórios desta espécie, porém, sabe-se que o *Lutzomyia antunesi* é o provável vetor.

Do ponto de vista epidemiológico, a existência dessa multiplicidade de espécies, torna importante a identificação correta dos parasitos patogênicos ao homem e a determinação da sua distribuição geográfica e transmissão, não apenas para um melhor entendimento da epidemiologia e estudos biológicos básico que auxiliem na determinação da unidade taxonômica, mas também para que seja adotada uma terapêutica adequada aos pacientes, uma vez que certos parasitos podem causar manifestações clínicas graves, como a leishmaniose mucocutânea e a leishmaniose cutânea anérgica difusa (Marsden, 1986; Silveira, 2001).

1.8. A CÉLULA HOSPEDEIRA

O protozoário *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório de macrófagos do hospedeiro vertebrado (Rey, 2001). Os macrófagos apresentam-se como a primeira linha de defesa para o hospedeiro, entretanto, na maioria das vezes, estes protozoários conseguem escapar de seus mecanismos de defesa e multiplicar-se no interior do vacúolo parasitóforo da célula. A destruição do parasito requer mudanças metabólicas acentuadas no macrófago, modificando seu meio intracelular e propiciando sua replicação em um meio inóspito à sobrevivência do parasito (Mentink & Mosser, 2000).

Os macrófagos pertencem ao sistema fagocítico mononuclear e apresentam várias funções, entre elas: (1) fagocitose; (2) apresentação de antígenos ao linfócito T dando início à resposta imune e (3) secreção de citocinas que ativam e promovem a resposta imune e inflamatória. Expressa em sua superfície receptores para a porção Fc das imunoglobulinas e para o produto C3b da cascata do sistema complemento, que facilita a fagocitose de antígenos, bactérias, protozoários e vírus recobertos com estas proteínas. Além disso, expressam o receptor MHC classe II, que permite apresentação de antígenos por estas células aos linfócitos T auxiliares (Benjamini, *et al.*, 2002).

Embora os macrófagos sejam as principais células efectoras para a eliminação da *Leishmania*, são também capazes de manter o parasito no seu interior permitindo sua replicação. Os mecanismos envolvidos na ativação dos macrófagos são complexos e ainda não totalmente entendidos, mas certamente envolvem uma rede de citocinas liberadas, local ou sistematicamente, quando da ativação do sistema imune.

Macrófagos infectados com *Leishmania* ativam precursores de célula T diferenciando-as em Th1 e Th2. Essas sub-populações secretam citocinas que estão relacionadas com a resolução (IFN- γ e IL-2, IL-12) ou exacerbação (IL-4, IL5, e IL10) da leishmaniose. A ativação dos macrófagos é determinada principalmente por uma citocina liberada pelas células natural killer (NK) e linfócitos T, o interferon gama (IFN- γ). Uma vez ativados apresentam aumentada sua capacidade fagocítica, microbicida e de apresentação de antígenos (Murray *et al.*, 1998).

As moléculas efectoras utilizadas pelos macrófagos ativados para destruir os patógenos são ainda objetos de intensa investigação. Até meados da década passada, pensava-se que o único mecanismo bioquímico induzível capaz de explicar as atividades microbicidas e tumoricidas dos macrófagos ativados era o fenômeno oxidativo o qual gera metabólitos tóxicos de oxigênio como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH $\cdot$) e, especialmente, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que tem sido responsabilizado pela atividade leishmanicida de macrófagos (Rosen *et al.*, 1995). No entanto, estudos posteriores permitiram esclarecer que além da resposta oxidativa, o macrófago possui outro mecanismo microbicida, como é o caso do óxido nítrico (NO).

O óxido nítrico é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina com o oxigênio molecular (O_2) gerando NO e L-citrulina por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), na presença de co-fatores como oxigênio e NADPH (Macmicking *et al.*, 1997). O óxido nítrico é um gás altamente reativo que possui vida média de 3 a 50 segundos devido sua rápida

oxidação e consequentemente geração de nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-) (Rocha *et al.*, 2002).



Figura 4- Esquema da reação de produção do óxido nítrico (Rocha, 1999).

Um importante aspecto referente à liberação do NO pelos macrófagos é o fato de que estas células, quando não ativadas, não sintetizam a enzima iNOS, por conseguinte, não liberam NO e não apresentam atividade microbicida. Somente após ativação, essas células expressam NOSi e consequentemente liberam NO em grandes quantidades e por longos períodos. A quantidade liberada correlaciona-se com o nível de atividade microbicida destas células (Green *et al.*, 1990). Por outro lado, a inibição da produção de NO através de inibidores específicos das NOS bloqueia também sua atividade microbicida.

O papel do óxido nítrico na destruição e morte de *Leishmania* tem sido demonstrado por diversos autores (Assreuy *et al.*, 1994; Mossalayi, 1999; Brandonisio, *et al.*, 2000). De acordo com Mauel & Ransijn (1997), os mecanismos de toxicidade do óxido nítrico afetam principalmente as enzimas da glicólise, o metabolismo respiratório, bem como os sistemas de transporte transmembrana do parasito.

1.8.1 Interação parasito- célula hospedeira

Sendo a *Leishmania* parasito intracelular obrigatório, o estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado, inclusive no homem, depende da manutenção e multiplicação das formas amastigotas dentro do macrófago. No entanto, a sobrevivência da *Leishmania* no hospedeiro vertebrado depende da capacidade das promastigotas e amastigotas evadirem-se dos mecanismos de defesa do hospedeiro vertebrado. Neste sentido, começa uma batalha entre o parasito, que utiliza mecanismos de escape, e os fenômenos de defesa das células do hospedeiro, que serão comentados a seguir.

1.8.2 Ação do sistema complemento

A sequência de acontecimentos, a partir do momento da picada do inseto vetor até o aparecimento de sintomas na leishmaniose, depende da espécie da *Leishmania* e de fatores intrínsecos do hospedeiro incluindo características genéticas e a resposta imunológica.

Após a transmissão da *Leishmania*, fatores específicos e inespecíficos do hospedeiro estão envolvidos no controle ou progressão da doença.

A inoculação das formas promastigotas no hospedeiro vertebrado pelo vetor desencadeia mecanismos de defesa anteriores à resposta imune específica representados pela resposta inflamatória aguda inespecífica da qual participam fatores séricos e celulares.

O efeito lítico do soro normal é desencadeado pela ativação da via clássica ou alternativa do complemento pelo parasito, sendo responsável pela destruição da maioria das formas promastigotas inoculadas pelo flebotomíneo (Mosser et al. 1986). Assim, somente uma pequena fração do inóculo infectante (promastigotas metacíclicas) consegue, efetivamente, internalizar-se em macrófagos e contribuir para o estabelecimento de uma infecção (Hill et al., 1983). A resistência das formas promastigotas metacíclicas à lise do complemento deve-se a composição da membrana citoplasmática desse estágio do parasito,

que é constituída de uma densa molécula de lipofosfoglicano (LPG) que impediria a deposição do complexo de ataque a membrana (C5b-9) na superfície do parasito promovendo a lise celular (Puentes *et al.*, 1989; Sacks *et al.*, 1990). Outra molécula presente na superfície das promastigotas metacíclica e que contribui para a resistência à lise é uma glicoproteína (gp63), que age clivando o C3b em uma forma que não consegue fixar o complexo C5b-9 (Brittingham *et al.*, 1995; Brittingham and Mosser, 1996), representando assim uma barreira de proteção à ação lítica do complemento (Sacks *et al.*, 1990).

1.8.3 Adesão da *Leishmania* ao macrófago

Uma vez superada a ação do sistema complemento, as promastigotas metacíclicas seguem aderindo à membrana do macrófago dando continuidade ou não a infecção e a manutenção do ciclo biológico do parasito.

O primeiro contato do parasito com a célula hospedeira envolve um sistema de interação receptor-ligante entre as moléculas de superfície de ambos, seguida por uma série de reações bioquímicas que podem levar à ativação ou à inibição das funções da célula hospedeira (Olivier, 1996).

Os sistemas receptor-ligante envolvidos na interação macrófago-*Leishmania* são: a) complemento, com a participação de moléculas como a gp63 e o lipofosfoglicano, LPG, na superfície do parasito, e os receptores locais C3 e receptores do complemento na superfície do macrófago; b) receptores de fibronectina; c) participação de manose-fucose e de seu receptor (De Souza & Vannier Santos, 1996).

Dentre as diferentes moléculas integrantes da membrana de superfície dos parasitos encontram-se glicoconjugados tais como a glicoproteína gp63 e glicolipídios como LPG, que são importantes na sua interação com o macrófago determinando a sobrevivência do parasito e sua infectividade (Ritting & Bogdan, 2000). A gp63 se liga a receptores de fibronectina, do

complemento e ao C3bi (Brittingham *et al.*, 1995), enquanto que o LPG se liga a receptores de manose presentes na superfície de macrófagos (Chang *et al.*, 1990). Em algumas espécies de *Leishmania*, o LPG apresenta mudanças em sua estrutura que são essenciais na interação com a célula hospedeira. Em formas promastigotas metacíclicas de *L. (Leishmania.) major* e *L. (Leishmania.) donovani*, este se apresenta duas vezes maior e têm seus açúcares terminais modificados em relação as promastigotas em fase logarítmica de crescimento, o que explicaria o porque as formas metacíclicas presente no inseto vetor e na fase estacionária de cultivo são mais infectantes (Alexander *et al.*, 1999).

1.8.4 Fagocitose e sobrevivência da *Leishmania*

A adesão da *Leishmania* à membrana do macrófago é pré-requisito para a fagocitose. Este processo de adesão desencadeia o recrutamento de receptores adicionais da membrana circundante do macrófago com um rearranjo do citoesqueleto. Neste rearranjo ocorre a emissão de extensões filamentosas pela célula que engloba o parasito formando um vacúolo parasitóforo que é circundado pela membrana de superfície da célula hospedeira (Handman, 2000). Após a internalização do parasito, o vacúolo sofre fusão com lisossomos secundários resultando no fagolisossomo, que apresenta compartimentos ácidos ricos em peptídeos microbicidas e enzimas hidrolíticas. Esta fusão resulta em uma maior acidez do fagolisossomo com pH ácido (4,7 e 5,2), o que dificultaria sua multiplicação (Antoine *et al.*, 1990). Neste microambiente hostil, o parasito utiliza várias estratégias para enfrentar os mecanismos microbicidas lançados pelo macrófago, tais como, baixo pH, hidrolases lisossomais, produtos do metabolismo do oxigênio, dentre outros.

No caso do pH, sabe-se que a *Leishmania* requer um meio neutro para multiplicar-se (Antonie *et al.*, 1998). No entanto, o vacúolo parasitóforo apresenta pH em torno de 4,7 a 5,2, portanto acidófilo. Vários estudos do metabolismo de amastigota em meio ácido indicam que

estas formas são acidófilas, resistentes às hidrolases lisossomais e, deste modo, totalmente adaptadas às condições do pH encontradas no pré-lisossomo (Antoine *et al.*, 1990; Antoine 1995; Burchmore & Barrett, 2001). Portanto, a sobrevivência da *Leishmania* no fagolisossomo vai depender da capacidade de transformação da forma promastigota na forma amastigota, uma vez que esta forma é acidófila e, portanto, melhor adaptada às condições oferecidas pelo meio. Um outro mecanismo que contribui para a sobrevivência do parasito é a ação proteolítica da gp63, que age degradando enzimas lisossômicas e exibindo atividade ótima sob as condições acidófilas do fagolisossomo (Seay *et al.*, 1996).

Quanto ao ataque ao parasito através dos produtos do metabolismo do oxigênio, tais como o superóxido e o peróxido de hidrogênio, trabalhos experimentais têm demonstrado que a entrada do parasito através da forma promastigota utilizando receptores de CR1 e CR3 presentes na superfície dos macrófagos parece ser essencial para a sobrevivência intracelular da forma promastigota infectante, pois a entrada através destes receptores promove baixo metabolismo oxidativo no macrófago (Brittingham & Mosser, 1996). A presença de moléculas de fosfatase ácida na membrana dos parasitos também contribui para a redução da resposta oxidativa (Grew *et al.*, 1988). As amastigotas desencadeiam menor metabolismo oxidativo quando comparadas as promastigotas (Burchmore & Barrett, 2001), adaptando-se melhor ao meio tóxico do fagolisossomo. Além disso, produzem superóxido dismutase que as protege de metabólitos do oxigênio produzidos pelos macrófagos durante a explosão respiratória (Augusto *et al.*, 1996). Em fase logarítmica de cultivo, *in vitro*, as amastigotas são mais resistentes à presença do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) do que as promastigotas. Esta diferença foi relacionada à enzima catalase presente nas amastigotas e ausente nas promastigotas (Alexander *et al.*, 1999).

1.9 ENSAIOS *IN VITRO* COM *LEISHMANIA*

A necessidade do entendimento dos processos envolvidos na interação parasito-hospedeiro *in vivo* tem despertado um grande interesse em ensaios experimentais *in vitro* que possam "mimetizar" o que ocorre na infecção natural por *Leishmania*. Nos últimos anos, estudos *in vitro* têm proporcionado grandes avanços no entendimento da doença, quer nos aspectos imunológicos, bioquímicos ou terapêuticos (Hay *et al.*, 2001; Brandonisio *et al.*, 2000; Delorenzi *et al.*, 2001). Um simples sistema *in vitro* tem sido seguido como modelo padrão. Este consiste em um sistema isolado utilizando formas promastigotas de *Leishmania* e células fagocíticas mononucleares, macrófagos, (principal hospedeira do parasito), sob condições estabelecidas de temperatura (35°C) e CO₂ (5%) (Arora *et al.*, 1991; Soares *et al.*, 1997).

As formas promastigotas de *Leishmania* podem ser cultivadas *in vitro* usando meios artificiais como o meio bifásico NNN (Novy-Macneal-Nicolle), meio líquido RPMI 1640 dentre outros. O crescimento dá-se em condições de aerobiose e a temperatura ideal é de 26°C. As promastigotas podem apresentar-se em formas variadas ao longo do crescimento em cultura, sendo que as formas utilizadas para a infecção devem estar em fase estacionária de crescimento. Nesta fase os parasitos apresentam-se sob forma fusiforme, com flagelos de 2 a 3 vezes maior que o corpo, com alta mobilidade e quase sem sinais de divisão celular (Rey, 2001). É na fase estacionária que temos as formas mais infectantes de *Leishmania*, as promastigotas metacíclicas.

A infectividade máxima para cultura de macrófagos *in vitro* e em animais de laboratório ocorre durante a fase estacionária de crescimento e entre o 5º e 7º dia após o processo de maturação para o inseto vetor (Sacks & Perkins 1984; 1985). Esta infectividade pode variar entre as diversas espécies de *Leishmania* e entre cepas de uma mesma espécie (Sacks & Perkins, 1984).

Rey *et al* (1990) ao realizarem um estudo comparativo do potencial infectivo *in vitro* de formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) sp.* em diferentes estágios de crescimento, observaram que cepas de *Leishmania (Viannia) panamensis* apresentavam-se mais infectantes no 6º dia de cultivo (início da fase estacionária), enquanto que cepas de *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* apresentavam infectividade máxima no 8º e 10º dia de cultivo (término da fase estacionária), respectivamente, e que estas observações estavam relacionadas com mudanças morfológicas ocorridas durante o processo de crescimento, quando então estas formas apresentavam-se pequenas e com alta motilidade, lembrando as formas infectivas transmitidas pelo inseto vetor.

Ao investigar a metaciclo genese e a capacidade infectante *in vitro* de formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania (Leishmania) infantum*, Louassini *et al.* (1998) relataram que a infectividade máxima para cepas desta espécie foi observada no 4º dia de cultivo mostrando grande porcentagem de macrófagos infectados e um aumento no número de parasitos no interior dos macrófagos.

Segundo Mendez *et al.* (2000) a infectividade de formas promastigotas de *Leishmania* está também relacionada às condições de temperatura que estes parasitos são incubados. Avaliando a capacidade infectante das formas promastigotas de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, os mesmos autores observaram que *L. (L.) infantum* apresentava infectividade limitada em relação à outra espécie, a qual apresentava notável infecção e que isto era atribuído às condições de temperatura em que as culturas eram incubadas (37°C) após a infecção com *Leishmania*. Sendo assim, *L. (L.) infantum* apresentou-se mais infectante quando incubada a 26°C, enquanto que *Leishmania (L.) donovani* à 37°C.

Ainda em relação à temperatura de incubação Arora *et al.* (1991) observaram que à 37°C, macrófagos são capazes de destruir formas amastigotas de *Leishmania (L.) donovani* em

poucas horas de infecção, enquanto a 35°C os parasitos são capazes de se multiplicar intensamente no interior dos macrófagos sendo mais resistentes à destruição.

Este sistema *in vitro* tem também permitido estudos bioquímicos que podem avaliar o papel do óxido nítrico, como agente microbicida na destruição de formas intracelulares de *Leishmania* (James, 1995; Vouldoukis *et al.*, 1999). Neste sentido, tem se observado um efeito aumentado da produção de óxido nítrico e elevada destruição dos parasitos quando macrófagos infectados são previamente estimulados com IFN- γ e TNF- α (Assreuy *et al.*, 1994; Pinelli *et al.*, 2000), assim como com lipopolissacarideo de bactéria (LPS) e que esta produção de óxido nítrico bem como a atividade leishmanicida apresentam-se reduzidos, com conseqüente baixa destruição intracelular, quando adicionado em culturas um inibidor da síntese do óxido nítrico, N^G monometil-L-arginina (L-N^GMMA) (Brandonisio *et al.*, 2000;) demonstrando o papel microbicida do óxido nítrico na leishmaniose, com uma possível aplicação prática da regulação imunológica e farmacológica da síntese do óxido nítrico no tratamento desta infecção (Panaro *et al.*, 1999).

Outro parâmetro que tem sido utilizado nos ensaios *in vitro* é a atividade leishmanicida de drogas, tanto daquelas que já estão preconizadas no tratamento das leishmanioses (Stibogluconato de sódio, Pentamidina) avaliando a toxicidade das mesmas (Roberts *et al.*, 1995), bem como a busca alternativa de drogas medicinais com bioatividade potencialmente menos tóxicas que as atualmente utilizadas e que apresentem baixo custo (Muñoz *et al.*, 1994; Delorenzi *et al.*, 2001).

O modelo animal mais estudado para esses ensaios *in vitro* tem sido camundongos da linhagem BALB/c. Este, quando infectado experimentalmente com parasitos do gênero *Leishmania*, desenvolvem resposta celular tipo Th2 com baixa produção de IFN- γ e altos níveis de IL-4, permitindo a sobrevivência e a multiplicação desses parasitos no interior da célula hospedeira o que os torna suscetíveis à infecção por espécies de *Leishmania* causadoras

de leishmaniose tegumentar (DeKrey *et al.*, 1998). Estudos experimentais recentes têm revelado sucesso também na interação *in vitro* de *Leishmania* com macrófagos de cães, revelando que estes não só são suscetíveis à infecção *in vitro* por promastigota de *Leishmania (L.) infantum*, como também são capazes de produzir óxido nítrico, bem como expressam altos níveis da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), sugerindo que a infecção com macrófagos deste animal é um bom modelo *in vitro* para futuras investigações da interação parasito-célula hospedeira, em cães, um hospedeiro natural do parasito *Leishmania* (Pinelli, *et al* 2000; Brandonisio, *et al.*, 2000).

1.10 JUSTIFICATIVA

A viabilidade dos sistemas *in vitro* tem proporcionado grandes avanços e um melhor entendimento nos processos de interação parasito-hospedeiro. Na leishmaniose estudos direcionados neste sentido têm revelado os comportamentos bioquímicos e imunológicos, além de ter despertado grande interesse na aplicabilidade de testes com fins terapêuticos. Em nossa literatura, constata-se diversos trabalhos relacionados a espécies de *Leishmania* do Velho Mundo como *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* agentes etiológicos de leishmaniose visceral e *Leishmania major* de tegumentar, revelando que estas espécies apresentam-se como bom modelo para ensaios *in vitro* quer na interação de *Leishmania* com macrófagos de camundongos BALB/c, como de caninos e humanos. No entanto, até o presente momento poucos são os relatos em nossa literatura informando sobre o comportamento *in vitro* das espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, mais precisamente da região Amazônica, onde a existência de uma multiplicidade de espécies de *Leishmania* revela o caráter endêmico da região. Diante disso, decidimos neste trabalho avaliar o comportamento biológico *in vitro* das espécies de *Leishmania* pertencentes ao subgênero *Viannia*, todas agentes etiológicas de leishmaniose tegumentar, tendo como parâmetro a infectividade destas

espécies em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, com o intuito de certificar se este sistema tem aplicabilidade com as espécies *Viannia* juntamente com o modelo animal padrão (camundongos BALB/c) que se tem utilizado.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o comportamento *in vitro* de cepas de *Leishmania* do subgênero *Viannia* da Amazônia Brasileira, na infecção de macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem BALB/c.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar e comparar a infectividade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com cepas de *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, isoladas de casos clínicos de leishmaniose cutânea localizada (LCL) e leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM), com *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lainsoni*.
- Avaliar a produção de óxido nítrico (NO), pela dosagem de nitritos (NO₂⁻) em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com as espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* citadas acima.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS DE *Leishmania*

Foram utilizadas 30 cepas de *Leishmania* do subgênero *Viannia* distribuídas em 6 grupos contendo cinco cepas cada: (I) *L. (V.) braziliensis*, isoladas de casos clínicos de leishmaniose cutânea localizada (LCL), (II) *L. (V.) braziliensis*, isoladas de casos clínicos de leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM), (III) *L. (V.) guyanensis*, (IV) *L. (V.) shawi*, (V) *L. (V.) naiffi* e (VI) *L. (V.) lainsoni*. As amostras foram isoladas de casos humanos e apenas dois de animais silvestres procedentes de várias localidades da região Amazônia (Tabela 3) e preservadas no criobanco do Laboratório de Leishmaniose do Instituto Evandro Chagas.

3.2 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem BALB/c machos e fêmeas, de 45 a 60 dias de idade, fornecidos pelo biotério central do Instituto Evandro Chagas-SVS, mantidos no biotério experimental do Laboratório de Leishmaniose –IEC em condições apropriadas de ambiente e ração e água, conforme orientação do Dr. Adevaldo da Silva (responsável pelo biotério).

3.3 MANUTENÇÃO DA VIRULÊNCIA DAS CEPAS DE *Leishmania*

Formas promastigotas de *Leishmania* mantidas em nitrogênio no criobanco do Laboratório do Programa de Leishmaniose do serviço de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas foram preparadas em suspensão de 0.1mL de solução salina a 0.9% na concentração de 2×10^6 promastigotas/mL. Esta suspensão foi inoculada em hamster *Mesocricetus auratus* por injeção intradérmica no coxim plantar esquerdo e direito para manutenção da virulência do parasito.

Tabela 3- Designação das cepas de *Leishmania* utilizadas no estudo.

REGISTRO	ESPÉCIE	ORIGEM GEOGRÁFICA
MHOM/BR/1995/M15280	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> / LCM	Paragominas-PA
MHOM/BR/1996/M15970	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> / LCM	Monte Dourado-PA
MHOM/BR/1995/M15493	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> / LCM	Abrel Figueiredo-PA
MHOM/BR/1999/M17323	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> / LCM	Paragominas- PA
MHOM/BR/1992M13970	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> / LCM	Altamira-PA
MHOM/BR/1994/M15140	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> / LCL	Paragominas- PA
MHOM/BR/1999/M17593	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> / LCL	Itaituba- PA
MHOM/BR/2001/M19667	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> / LCL	Santarém-PA
MHOM/BR/2001/M19673	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> / LCL	Santarém-PA
MHOM/BR/2000/M19344	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> / LCL	Carajás-PA
MHOM/BR/1999/M17332	<i>Leishmania (V.) shawi</i> /LCL	Tomé-Açu- PA
MHOM/BR/2001/M19868	<i>Leishmania (V.) shawi</i> /LCL	Redenção- PA
MHOM/BR/1999/M17312	<i>Leishmania (V.) shawi</i> /LCL	Tailândia- PA
MHOM/BR/1998/M17182	<i>Leishmania (V.) shawi</i> /LCL	Ulianópolis- PA
MCEB/BR/1984/M8408	<i>Leishmania (V.) shawi</i> /LCL	Carajás-PA
MHOM/BR/1990/M13138	<i>Leishmania (V.) guyanensis</i> /LCL	Monte Dourado- AP
MHOM/BR/1997/M16524	<i>Leishmania (V.) guyanensis</i> /LCL	Macapá- AP
MHOM/BR/1998/M16743	<i>Leishmania (V.) guyanensis</i> / LCL	Oiapoque- AP
MHOM/BR/1999/M17347	<i>Leishmania (V.) guyanensis</i> / LCL	Porto Grande- AP
MHOM/BR/1975/M4147	<i>Leishmania (V.) guyanensis</i> / LCL	Jari-AM
MHOM/BR/2001/M19811	<i>Leishmania (V.) naiffi</i> / LCL	Melgaço- PA
MHOM/BR/1991/M13187	<i>Leishmania (V.) naiffi</i> /i/ LCL	Õbidos- PA
MHOM/BR/1993/M14229	<i>Leishmania (V.) naiffi</i> / LCL	Amazonas
MHOM/BR/1994/M14947	<i>Leishmania (V.) naiffi</i> / LCL	Mazagão- AP
MDAS/BR/1989/M5533	<i>Leishmania (V.) naiffi</i> / LCL	Jari-AM
MHOM/BR/1995/M15265	<i>Leishmania (V.) lainsoni</i> / LCL	Ananindeua- PA
MHOM/BR/1993/M14263	<i>Leishmania (V.) lainsoni</i> / LCL	Benevides- PA
MHOM/BR/1999/M18048	<i>Leishmania (V.) lainsoni</i> / LCL	Icoaraci- PA
MHOM/BR/1994/M15143	<i>Leishmania (V.) lainsoni</i> / LCL	Pacajá- PA
MHOM/BR/1981/M6426	<i>Leishmania (V.) lainsoni</i> / LCL	Bragança-PA

3.4 ISOLAMENTO DO PARASITO EM *hamster* (*Mesocricetus auratus*)

Os animais foram examinados semanalmente até o aparecimento da lesão no local de inoculação, quando então foram sacrificados para realização de biopsia da lesão cutânea. O material biopsiado foi transferido para meio de cultura bifásico ágar-sangue Difco B45 (Laboratories, Detroit, Mich., USA) (Apêndice) e posteriormente repassados e mantidos em 15mL de meio RPMI 1640 (SIGMA) (Apêndice), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB) (CULTILAB), inativado a 56°C por 30 minutos, 1% de penicilina-G cristalina 100 U/mL, 1% de gentamicina 10µg/mL, 1% de 2mM L-glutamina e 1% 10mM hepes, para obtenção de parasitos em maior quantidade, necessária para os experimentos. Os parasitos foram cultivados à temperatura aproximada de 26°C e observadas em intervalos de 4 a 7 dias até atingirem a fase estacionária de crescimento, quando então foram utilizadas.

3.5 CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/c

Macrófagos utilizados nos ensaios de interação serão obtidos da cavidade peritoneal de camundongos da linhagem BALB/c de 45 a 60 dias de idades. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os macrófagos adquiridos através de lavagem peritoneal injetando-se com agulha e seringa 5 a 6ml de PBS pH 7,2 (Apêndice) estéril gelado no peritônio e massageando-o lentamente. Após 5 minutos fez-se um pequeno corte no peritônio e com auxílio de pipeta Pasteur estéril o líquido foi aspirado e colocados em banho de gelo. Em seguida, a suspensão de células foi lavada com PBS, sendo submetida a centrifugação de 1500 x g por 10 minutos, a 5°C (Arora *et al.*, 1991).

A concentração das células peritoneais foi quantificada em câmara de Neubauer e ajustada para 2×10^6 macrófagos/mL em meio RPMI sem fenol (SIGMA), suplementado com 1% de SFB, 1% de penicilina-G cristalina 100 U/mL, 1% de gentamicina 10µg/mL, 1% de 2mM L-glutamina e 1% de 10mM HEPES. Uma alíquota de 50µl desta suspensão foi

adicionada em cada lamínula de vidro estéril redonda de 12 mm de diâmetro (GLASSTECNICA) as quais foram incubadas por 1 hora a 35°C em estufa contendo 5% CO₂, para fixação dos macrófagos. Em seguida, as lamínulas foram lavadas em banho por três vezes em PBS para remoção das células que não aderiram e na etapa subsequente incubadas em placas de 24 poços (COSTAR) contendo 500 µl de RPMI suplementado por 24 horas a 35°C em estufa contendo 5% de CO₂.

3.6 INFECÇÃO DAS CULTURAS DE MACRÓFAGOS COM CEPAS DE *Leishmania* (*Viannia*) *sp.*

Para a infecção dos macrófagos peritoneais foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania* em fase estacionária de cultivo. A suspensão de parasitos teve sua concentração quantificada em câmara de Neubauer ajustada para 8×10^6 parasitos/mL e 50 µl desta suspensão será adicionada à cultura de macrófagos para obtenção da infecção. Após a adição de *Leishmania*, as placas foram incubadas durante 24 horas a 35°C em estufa contendo 5% de CO₂. Em seguida, as lamínulas foram retiradas, lavadas três vezes em PBS, coradas pelo Giemsa e montadas sobre lâminas de vidro para microscopia (24 x 76 mm) utilizando-se como resina Permount. Os sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados (300 µl) foram coletados e submetidos a centrifugação a 1200 x g por 5 minutos e estocados a -20°C até o momento do uso para avaliar a produção de óxido nítrico (NO).

3.7 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE INFECÇÃO

A infectividade *in vitro* dos macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c e o grau de parasitismo apresentado pelas cepas de *Leishmania* foi determinado pela quantificação das células em microscópio óptico comum. As lamínulas foram contadas, em triplicatas, quantificando-se 200 células por lamínula, contando-se o número de macrófagos

infectados por *Leishmania* e o número de macrófagos não infectados. Além disso, foi determinado o número médio de parasitos por macrófago. Este parâmetro é denominado de Índice de Infecção e foi calculado para cada lamínula conforme Louassini *et al.* (1998):

$$\text{Índice de Infecção} = \text{Porcentagem de macrófagos infectados} \times \text{Número médio de parasitos por macrófago}$$

3.8 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

3.8.1 Determinação dos níveis de nitrito

A produção de óxido nítrico foi determinada através da concentração de nitritos presentes no sobrenadante de culturas de macrófagos infectados com formas promastigotas de *Leishmania* pelo método de Griess (Green *et al.*, 1990). Este método consiste em uma reação colorimétrica, no qual o sobrenadante da cultura (300 µl) foi incubado com igual volume dos reagentes de Griess (1% de sulfonilamida, 0,1% de dihidrocloreto de naftilenodiamina e 2,5% de ácido orto-fosfórico) recém preparado, durante 10 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (ZEISS) com densidade ótica de 540nm, contra um branco constituído por meio de cultura (RPMI) e reagente de Griess em volumes iguais. Os resultados foram expressos em de µM de NO_2^- , com base numa curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (NaNO_2) dissolvido em meio de cultura.

Em todos os ensaios foram utilizados como controle o sobrenadante de cultura de macrófagos sem parasito. Todos os testes serão realizados em triplicatas.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram apresentados como média $\pm$ erro padrão de 5 experimentos. Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas utilizando-se o Programa STATISTICA com a análise de variância ANOVA-MANOVA seguido do teste de correção Duncan. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

3.10 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto intitulado “Estudo *in vitro* da infectividade de diferentes espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, agentes de LTA na Amazônia Brasileira, em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c” foi elaborado e submetido a apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPAN) do Instituto Evandro Chagas.

4. RESULTADOS

4.1 PORCENTAGEM DE MACRÓFAGOS INFECTADOS

A porcentagem de macrófagos infectados pelas cepas de *L. (V.) braziliensis* isoladas de casos clínicos de LCM (77%), *L. (V.) guyanensis* (75%), *L. (V.) shawi* (73%) e *L. (V.) naiffi* (75%) foram similares, não revelando diferença estatística quando comparados entre si, porém, superiores e significantes quando comparado com cepas de *L. (V.) braziliensis* isoladas de casos clínicos de LCL (66%) e *L. (V.) lainsoni* (68%) como demonstrado na figura

5.

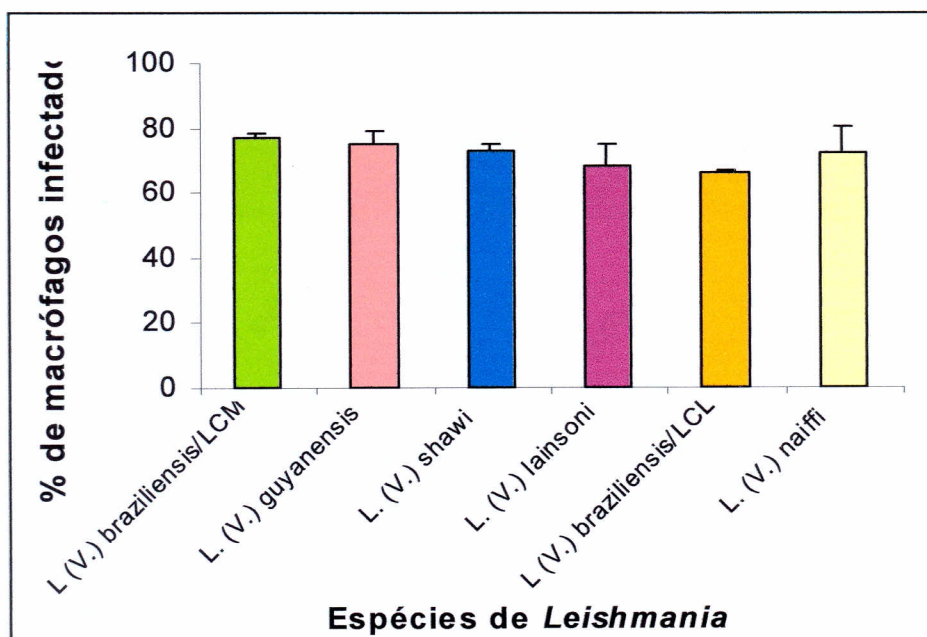


Figura 5. Porcentagem de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (Viannia) sp.*

4.2 NÚMERO DE PARASITOS POR MACRÓFAGOS INFECTADOS

Verificamos que o número de parasitos por macrófago infectado apresentou pouca variação entre as diferentes espécies de *Leishmania* estudadas (figura 6). Porém, a espécie *L. (V.) braziliensis*/LCM apresentou o maior número de parasito/macrófago (média de 5 parasitos/macrófago). Este resultado mostrou-se relevante quando comparado com a média de parasitos resultante da infecção com as cepas de *L. (V.) naiffi*, a qual apresentou média de 3 parasitos/macrófagos. Quanto às demais espécies, *L. (V.) braziliensis*/LCL, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lainsoni*, notou-se que apresentaram médias intermediárias de 4 parasitos/macrófagos. Na figura 7 observa-se um painel ilustrando a infecção *in vitro* por estas espécies.

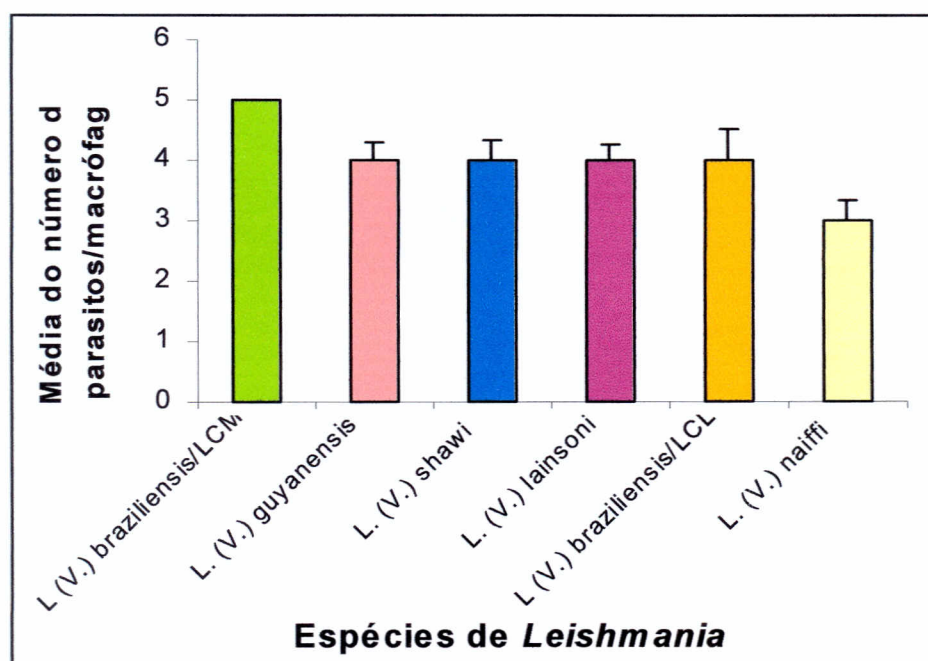


Figura 6. Número médio de parasitos por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com espécies de *Leishmania* (*Viannia*) *sp.*

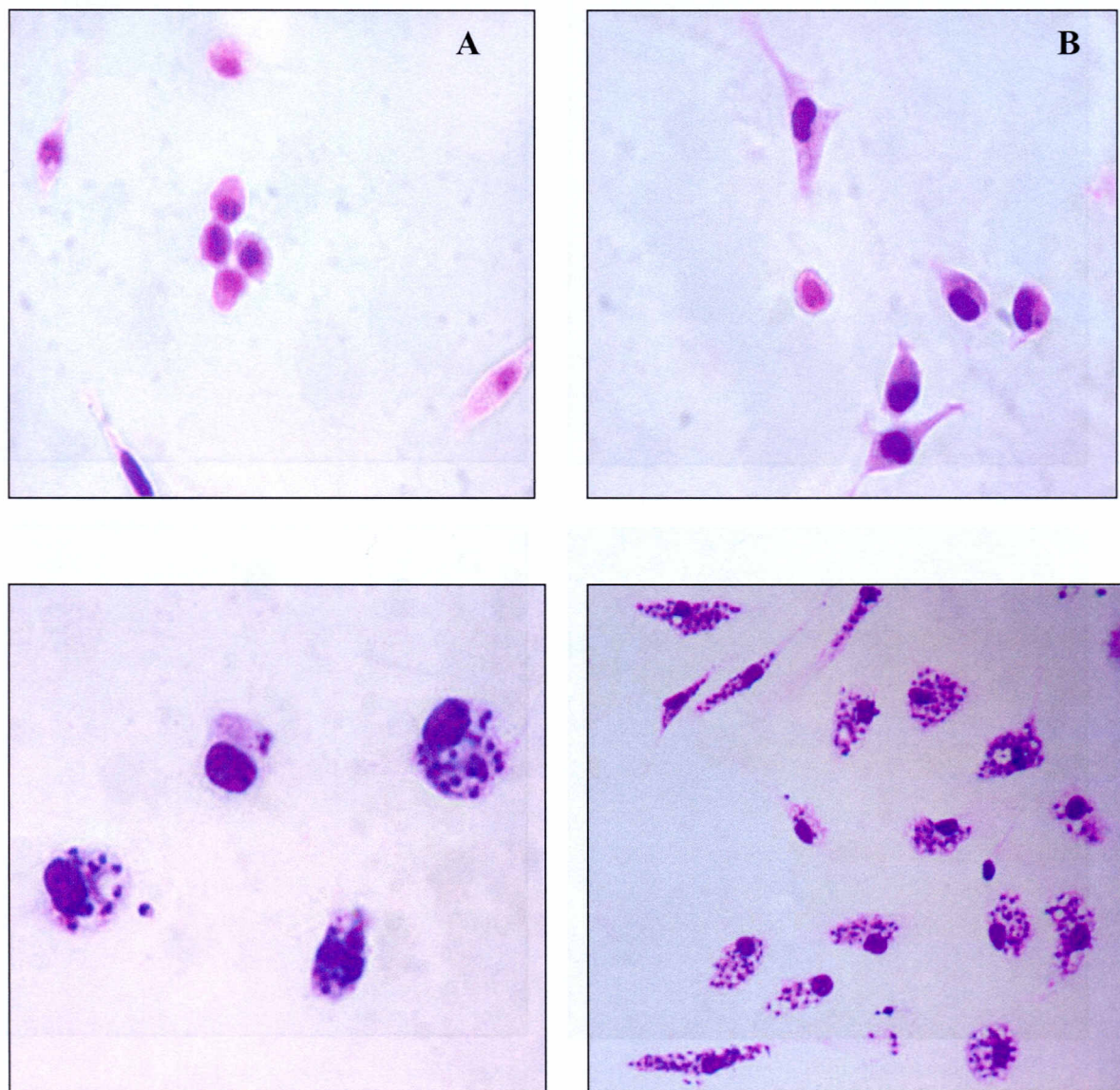


Figura 7A. Painel de fotomicrografias ilustrando a infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c com *Leishmania (Viannia) sp.*: (A e B) macrófagos sem infecção; (C) macrófagos infectados com *L.(V.) braziliensis* isolada de casos clínicos de leishmaniose cutânea localizada (LCL); (D) *L.(V.) braziliensis* isolada de casos clínicos de leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM). Aumento: 1000x

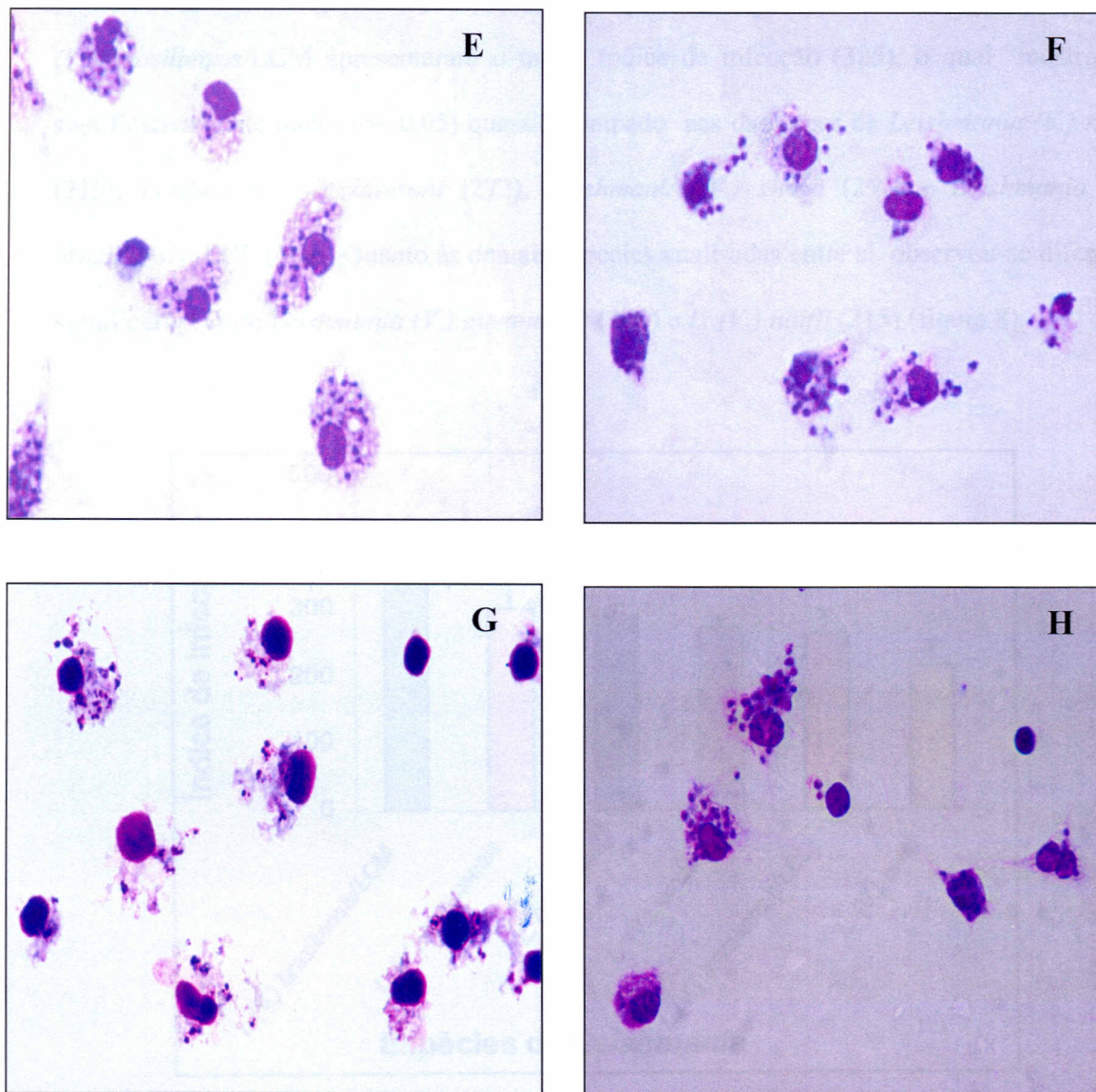


Figura 7B. Painele de fotomicrografias ilustrando a infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c com *Leishmania (Viannia) sp.*: (E) macrófagos infectados com *L. (V.) guyanensis*; (F) *L. (V.) shawi*; (G) *L. (V.) naiffi* e (H) *L. (V.) lainsoni*. Aumento: 1000x

4.3 ÍNDICE DE INFECÇÃO

Com relação ao índice de infecção, que é o resultado da porcentagem de macrófagos infectados vezes o número de parasitos por macrófago, observamos que cepas de *Leishmania (V.) braziliensis*/LCM apresentaram o maior índice de infecção (385), o qual mostrou-se significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado aos das cepas de *Leishmania (V.) naiffi* (215), *Leishmania (V.) lainsoni* (272), *Leishmania (V.) shawi* (292) e *Leishmania (V.) braziliensis*/LCL (264). Quanto às demais espécies analisadas entre si, observou-se diferença significativa entre *Leishmania (V.) guyanensis* (300) e *L. (V.) naiffi* (215) (figura 8).

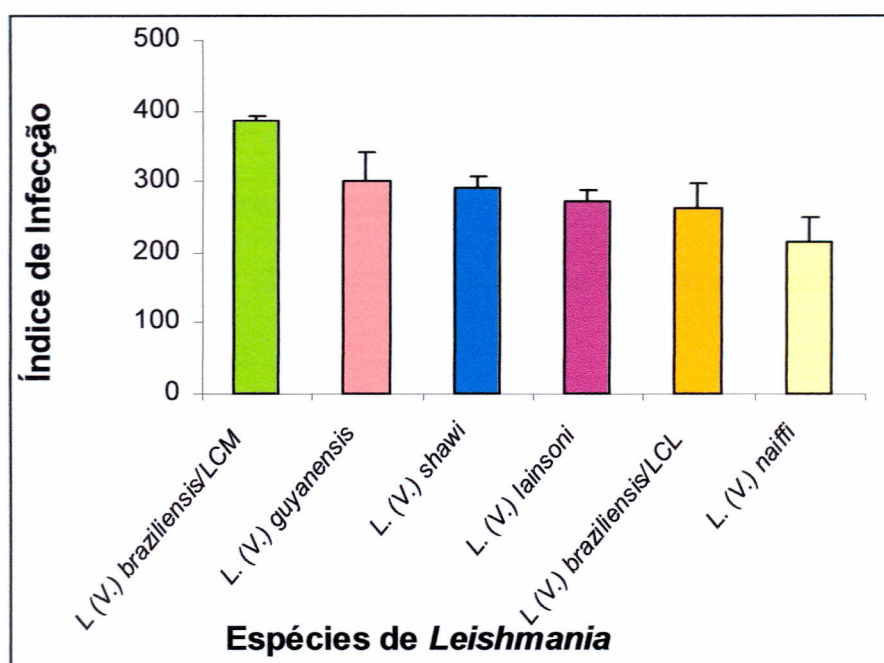


Figura 8. Índice de infecção em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com espécies de *Leishmania (Viannia) sp.*

4.4 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A produção de óxido nítrico (NO) foi analisada pelo método de Griess, de acordo com Green et al (1990), através do qual onde se determinou a quantidade de nitrito presente no sobrenadante das culturas de macrófagos 24 horas após a infecção dessas células.

A figura (9) mostra valores variáveis nas concentrações de NO (nitrito) presente nas culturas de macrófagos, com produção significativamente maior ($p < 0,05$) para as culturas de macrófagos infectados com *L. (V.) naiffi* ($4\mu\text{M}$) produção significativamente menor ($p < 0,05$) para as culturas de macrófagos infectados com *L. (V.) braziliensis*/LCM ($2,15\mu\text{M}$). Quanto às outras espécies, notou-se que os valores de NO (nitrito) presentes nas culturas de macrófagos infectados com *L. (V.) braziliensis*/LCL ($3\mu\text{M}$), *L. (V.) guyanensis* ($2,76\mu\text{M}$) e *L. (V.) shawi* ($2,96\mu\text{M}$) não mostraram significância ($p > 0,05$) quando comparadas entre si.

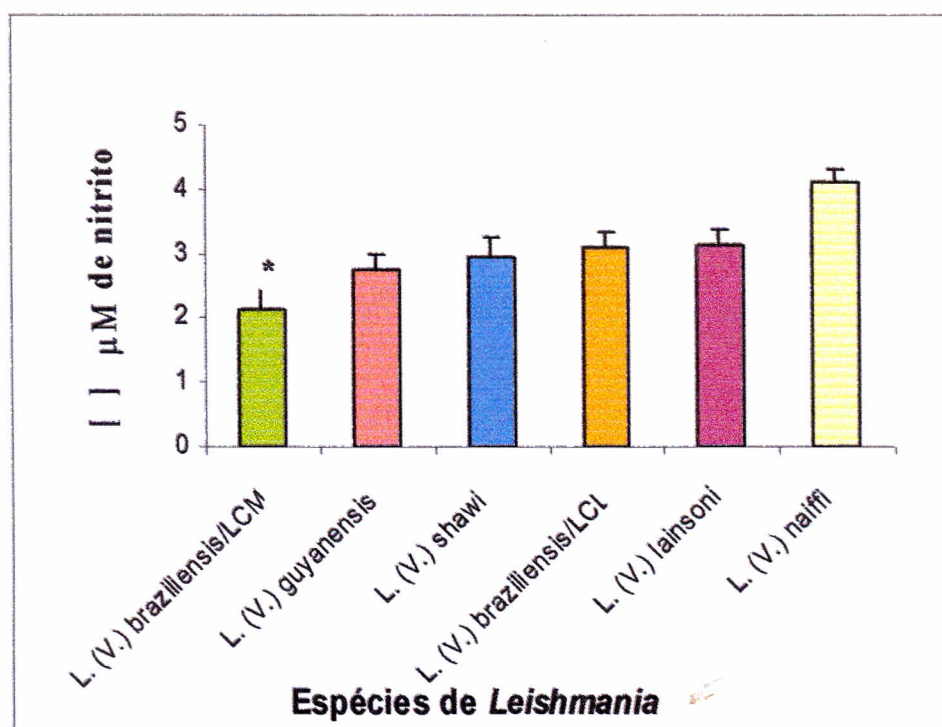


Figura 9. Níveis de NO (μM) nos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados com *L. (Viannia) sp*

5 DISCUSSÃO

O uso de macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c tem sido bem documentado em estudos experimentais, *in vitro*, para análise da sua interação com diferentes espécies de *Leishmania*, especialmente aquelas do subgênero *Leishmania* encontradas no Velho Mundo, como *L. (L.) infantum* (Grimm *et al.*, 1991), *L. (L.) donovani* (Mendez *et al.*, 2000) e *L. (L.) major* (Liew *et al.*, 1991). Entretanto, em relação às espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, todas autóctones do Novo Mundo, muito pouco tem sido investigado, constituindo uma lacuna no estudo da infecção, *in vitro*, do macrófago com o protozoário. Assim, o presente estudo foi idealizado visando investigar o potencial de infectividade das diferentes espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, agentes de LTA na Amazônia brasileira, em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, assim como, a produção de NO pelos macrófagos infectados com o intuito de contribuir com o conhecimento desse importante estágio da patogenia da LTA.

De acordo com nossos resultados apresentados na figura (8) observamos que as diferentes espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* apresentaram infectividade semelhante entre si com exceção de cepas de *L. (V.) braziliensis* isoladas de caso clínico de LCM e da espécie *L. (V.) naiffi*. Esta diferença de infectividade existente entre as espécies de *Leishmania* tem sido documentada em alguns trabalhos (Savoia *et al.*, 1991; Lainson & Shaw, 1989; 1990).

Considerando-se que, para melhor avaliar a infectividade das espécies de *Leishmania* foi necessário determinar o índice de infecção, o qual resulta diretamente da porcentagem de macrófagos infectados e do número de parasitos por macrófagos, faremos inicialmente alguns comentários sobre estes dois parâmetros isoladamente.

Em relação à porcentagem de macrófagos infectados, observou-se grande semelhança entre as espécies estudadas embora no caso de *L. (V.) braziliensis*/LCL e *L. (V.) lainsoni* tenha apresentado os menores valores no número de macrófagos infectados (figura 5). Esses resultados em relação *L. (V.) braziliensis*/LCL estão de acordo com os observados por Rey *et al.*, (1990), que detectaram um percentual de 68% do macrófagos peritoneais do camundongo BALB/c infectados por esta espécie. Por outro lado, faz-se importante mencionar que Madeira *et al.*, (1999) ao realizarem ensaios *in vitro* com esta espécie em macrófagos peritoneais de cão, observaram uma taxa maior de infectividade (81%). Entretanto, deve ser observado que não só a célula hospedeira era procedente de um outro animal como também os autores não mencionaram a procedência das cepas de *L. (V.) braziliensis* usadas no referido estudo, se isolada de um caso clínico da forma LCL ou LCM. Ou seja, há possibilidade de que esses dois fatores tenham influenciado na taxa observada por esses autores, já que em nosso estudo observamos que cepas de *L. (V.) braziliensis*/LCM tiveram uma capacidade maior de infecção dos macrófagos do que as cepas *L. (V.) braziliensis*/LCL, e outro fator diz respeito a possibilidade de uma maior vulnerabilidade do macrófago de cão para a infecção pela *L. (V.) braziliensis*. Em relação às demais espécies utilizadas no estudo, observou-se similaridade na porcentagem de macrófagos infectados, demonstrando que as mesmas apresentam capacidade semelhante de internalizar na célula hospedeira. Neste sentido, vale a pena ressaltar que não encontramos dados na literatura que pudéssemos confrontar aos nossos achados, principalmente com as espécies *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, e *L. (V.) naiiffi* registrando-se assim pela primeira vez estudo *in vitro* com essas espécies. Não obstante, experiências com essas espécies no Laboratório de Leishmaniose do Instituto Evandro Chagas, mostraram que elas apresentam boa infectividade *in vivo*, na manutenção de cepas em animais de laboratório, assim como um bom crescimento *in vitro* em meios de cultivo apropriados, com exceção da *L. (V.) naiiffi*, que será abordada posteriormente.

Diante da similaridade observada sobre a porcentagem de macrófagos infectados, questionamos se a infectividade estaria mais relacionada à capacidade do parasito em estabelecer-se e multiplicar-se na célula hospedeira. Em nossos resultados observamos que, com exceção da *L. (V.) braziliensis*/LCM e *L. (V.) naiffi*, as demais espécies apresentaram média semelhantes relativas ao número de parasitos/macrófago infectados (figura 5) o que refletiu em um padrão semelhante de infectividade para as espécies *L. (V.) braziliensis*/LCL, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*. Assim sendo, notamos que cepas de *L. (V.) braziliensis*/LCM, que tiveram média de 5 parasitos/macrófago foram as que apresentaram o maior índice de infectividade e cepas de *L. (V.) naiffi* que tiveram como média 3 parasitos por macrófago apresentaram menor índice de infectividade. Desse modo, demonstramos que a infectividade está diretamente relacionada a capacidade do parasito de multiplicar-se no macrófago, uma vez que em nossas condições *in vitro* a espécie de *Leishmania* que conseguiu evadir-se dos mecanismos microbicidas e multiplicar-se intensamente no interior dos macrófagos, como a *L. (V.) braziliensis*/LCM, foi a que demonstrou a maior capacidade de infecção. Por outro lado, o inverso ocorreu com a *L. (V.) naiffi*, já que esta não apresentou grande capacidade de multiplicar-se na célula hospedeira.

Com relação a *L. (V.) naiffi*, Lainson & Shaw (1990) relataram que o parasito apresenta bom crescimento em meios de cultivo, porém, este comportamento biológico *in vivo* mostrava-se limitado em pele de hamster, por exemplo, onde produz uma infecção inaparente ou com nódulos cutâneos inconspícuos contendo escassos parasitos na lesão. Desse modo, achamos que nossos resultados *in vitro* assemelharam-se aos achados *in vivo* por esses autores, uma vez que, apesar de apresentarem similaridade na porcentagem de macrófagos infectados por esta espécie, o número de parasitos multiplicados em seu interior foi baixo comparado com as outras espécies, sugerindo a *L. (V.) naiffi* após internalizar-se nos macrófagos, não conseguiu se multiplicar bem no interior destas células, o que veio

reproduzir em nossos ensaios na espécie de menor infectividade. Além disso, veio confirmar que a baixa infectividade desta espécie para os macrófagos de camundongos BALB/c pode estar relacionada também com o baixo grau patogênico desta espécie para o homem, já que, diferentemente das outras espécies estudadas a *L. (V.) naiffi* é a que tem sido encontrada menos freqüentemente infectando o homem na Amazônia e, nos poucos casos registrados essa infecção tem-se traduzido no homem em lesões cutânea simples e de fácil resolução e sem seqüelas.

Com respeito a *L. (V.) braziliensis*, embora a literatura enfatize que o número de parasitos na infecção em hamster mostre-se escasso (Lainson, R. 1982; Childs, *et al.*, 1984) nossos resultados *in vitro* demonstraram uma grande quantidade de amastigotas no interior dos macrófagos, tanto com cepas de *L. (V.) braziliensis/LCL*, com média de 4 parasitos/macrófago quanto nas cepas de *L. (V.) braziliensis/LCM*, com média de 5 parasitos/macrófago (figura 6), confirmando o potencial de infectividade desta espécie para o macrófago de camundongo BALB/c. Entretanto, cabe-nos lembrar que utilizamos um sistema isolado constituído apenas de uma célula com grande capacidade fagocítica, um fagócito profissional e o parasito *Leishmania* o que diferentemente do que tem-se *in vivo*, onde vários fatores podem estar atuando colaborando para o controle ou exacerbação do parasitismo na lesão. Dekrey *et al.*, (1998) ao realizarem experimentos *in vivo* em camundongos BALB/c observaram que a *L. (V.) braziliensis* induziu lesão cutânea discreta que dificilmente ulcerou, e que demorou por vezes até meses para surgir, além de apresentar uma escassez de parasito na lesão o que dificultou sua demonstração. De acordo com os mesmos autores esta baixa carga parasitária estaria modulada a altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de TNF- α produzidos por camundongos BALB/c quando infectados por esta espécie, ressaltando que o comportamento do parasito pode ser influenciado por fatores biológicos envolvidos nos diferentes modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

Outro ponto que nos chamou atenção neste trabalho foi a diferença intra-específica, notadamente entre as cepas de *L. (V.) braziliensis*, isoladas de diferentes formas clínicas. Cepas isoladas de leishmaniose cutânea localizada (LCL), uma forma mais branda da doença, apresentaram-se menos infectivas em relação às cepas isoladas de casos de leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM), uma forma mais grave da doença. Essa observação relativa a variação de infectividade intra-específica também foi constatada por Gomes *et al.*, (2001) ao analisarem a infectividade de cepas de *L. (L.) amazonensis* isolada de diferentes formas clínicas (LCL, LCDB, LCD), entre as quais as cepas isoladas da forma mais grave da doença (LCD) apresentaram maior infectividade. Além disso, um outro ponto a esclarecer seria de uma possível relação da variação intra-específica da infectividade com a existência de um polimorfismo genético entre cepas de uma mesma espécie isolada de diferentes formas clínicas de leishmaniose (Gomes *et al.*, 2002; Sodré *et al.*, 2002). A este respeito Gomes *et al.* (2002) embora tenham demonstrado a existência de polimorfismo genético intra-específico entre cepas de *L. (L.) amazonensis* isoladas de diferentes casos clínicos de LTA não puderam correlacionar essas diferenças com a forma clínica da doença. Do mesmo modo, Almeida (2000) observou que cepas de *L. (V.) braziliensis* isoladas de LCL e LCM apresentavam polimorfismo genético, entretanto os marcadores genotípicos usados não foram suficientes para estabelecer correlação com as manifestações clínicas. Assim, no caso do presente trabalho onde constatamos a existência de uma maior virulência das cepas de *L. (V.) braziliensis*/LCM acreditamos que futuras investigações ao nível de biologia molecular poderão elucidar esse comportamento biológico do parasito.

Com relação à destruição do parasito do gênero *Leishmania* dentro do macrófago tem sido demonstrado em macrófagos de camundongo BALB/c que atividade leishmanicida é mediada por reativos intermediários de oxigênio e de nitrogênio, especialmente o óxido nítrico (NO) (Liew *et al.*, 1990a). A importância desta atividade leishmanicida exercida pelos

macrófagos tem sido evidenciada pelo aumento na carga parasitária após a inibição com antagonista do NO (Liew & O'donnell, 1993). Por outro lado, há relatos que a *L. (L.) amazonensis* pode inibir diretamente a síntese de NO e bloquear o desenvolvimento da resposta imune do tipo Th1 favorecendo a exacerbação da doença (Balestieri *et al.*, 2002). Nossos experimentos mostraram níveis variáveis em relação à produção de NO nos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados com as espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, e estes apresentaram correlação inversa com o índice de infecção especialmente com cepas de *L. (V.) braziliensis* isoladas de casos clínicos de LCM, a qual apresentou menor produção de NO e maior infectividade quando comparada as demais espécies, estritamente quando comparada com *L. (V.) naiffi* que apresentou maior produção de NO e conseqüentemente menor infectividade. Corroborando com os nossos achados, tem sido mostrada associação entre altos níveis de NO e discreta presença da espécie *L. (L.) major* no interior de macrófago de camundongo (Liew *et al.*, 1990b).

Em relação a *L. (V.) braziliensis*, espécie utilizada em nosso estudo, que apresentou menores níveis na produção de NO, alguns autores têm observado que a infecção *in vitro* de cultura de macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c por esta espécie promove aumento na quantidade de formas intracelulares deste parasito mediante a adição do TGF- β , citocina que tem sido implicada em inibir o efeito microbicida de macrófagos (Barral *et al.*, 1993). Desse modo hipotetizamos que em relação a esta espécie (*L. (V.) braziliensis*/LCM) fatores relacionados ao parasito possam estar modulando a resposta microbicida do macrófago resultando em uma baixa produção de NO e conseqüentemente alta infectividade por esta espécie. Interessante salientar que situação inversa foi observada em relação a *L. (V.) naiffi* (alta produção de NO e baixa infectividade). Em relação a esta espécie sugerimos que o parasito apresentou reduzida habilidade frente a uma resposta aos mecanismos destrutivos dos macrófagos, e assim sendo, supomos que o mecanismo leishmanicida de produção de NO

possa estar atuando na destruição deste parasito no interior dos macrófagos impedindo assim sua multiplicação no interior dos mesmos, traduzindo em baixa infectividade por esta espécie em relação as demais. Quanto à produção de NO de macrófagos infectados com as outras espécies de *Leishmania* (*L. (V.) shawi*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) lainsoni*) estudadas observamos que houve correlação inversa com a infectividade destas espécies.

Finalizando, gostaríamos de mencionar algumas observações a respeito dos ensaios *in vitro* registrados na literatura, os quais têm associado a infectividade do parasito do gênero *Leishmania* ao seu tempo de cultivo em meios artificiais demonstrando diminuição da infectividade com passagens sucessivas *in vitro* (Zakai *et al.*, 1998). Em nossos experimentos utilizamos promastigotas em fase estacionária de cultivo, fase que apresenta maior número de parasitos metacíclicos infectivos, após isolamento do hamster e somente uma passagem em meio RPMI 1640, o que nos forneceu suporte de que a diferença de infectividade observada entre as espécies usadas em nosso trabalho não poderia estar relacionada ao número de passagens *in vitro*. Outro fator que tem sido descrito relacionado a infectividade por *Leishmania* é a temperatura em que esses parasitos têm sido utilizados nos ensaios. Mendez *et al.*, (2000) ao utilizarem *L. (L.) donovani* na infecção *in vitro* de macrófagos de hamster observaram que a 37°C esta espécie apresentou maior infectividade. Semelhantes achados foram atribuídos a *L. (L.) infantum*. Durante nossos ensaios adotamos a temperatura de 35°C, uma vez que ao utilizarmos temperatura mais elevada (37°C), a qual tem sido preconizada na literatura observamos que as espécies de *Leishmania* utilizadas no nosso estudo adotavam morfologia de amastigotas e raramente internalizavam nos macrófagos, o que não foi observado a 35°C. Nossa observação foi condizente com os achados de Arora *et al.*, (1991) que demonstraram que a 35°C a espécie *L. (V.) donovani* eram capazes de multiplicar-se intensamente no interior de macrófagos sendo mais resistentes à destruição pela célula hospedeira. Esta diferença de temperatura ideal de infectividade em relação à espécie *L. (L.)*

donovani e *L. (L.) infantum* e as utilizadas em nosso estudo pode ser sugerida pelo seguinte fato: *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* são agentes de leishmaniose visceral, onde o parasito infecta macrófagos de órgãos como baço e fígado onde a temperatura é relativamente mais elevada do que na pele, podendo assim resistir a esta temperatura (37°C), diferente das espécies utilizadas em nosso estudo que são essencialmente dermatrópicas, sendo assim sensíveis a esta temperatura.

6 CONCLUSÕES

Cepas de *L. (V.) braziliensis* isoladas de leishmaniose cutâneo-mucosa apresentaram maior índice de infectividade em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e menores níveis de produção de NO.

Houve diferença intra-específica de infectividade nas cepas de *L. (V.) braziliensis* isoladas de diferentes formas clínicas (LCL e LCM) de LTA.

A espécie *L. (V.) naiffi* apresentou menor índice de infectividade e conseqüentemente maior produção de NO.

As espécies *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, e *L. (V.) lainsoni* apresentaram padrão semelhantes de infectividade.

APÊNDICE

I- Corante Giemsa

3g de Giemsa

260 mL álcool metílico

140 mL glicerol

II- Água tamponada pH 7,5

3g Na_2HPO_4

0,6g KH_2PO_4

1000 mL água destilada

III- Meio de Cultura Difco B45

40g Difco B45

120 mL sangue de coelho desfibrinado (adicionar 0,2 mL de gentamicina
para cada 20 mL de sangue)

1000 mL água destilada

IV- Solução tampão de salina fosfatada (PBS) pH 7,2

1,04g Na_2HPO_4

0,358g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ H}_2\text{O}$

7,905g NaCl

1000 mL água destilada

V- Meio RPMI (estoque) pH 7,2

8,4 g	RPMI
2g	Na ₂ CO ₃
1000 mL	água destilada

VI- Meio RPMI (uso) pH 7,2

RPMI estoque contendo 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de hepes, 1% de penicilina e gentamicina

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSEL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal Cell Science**, v. 112: 2993-3002, 1999.

ALI, A. Leishmaniasis and HIV/AIDS co-infections: review of common features and management experiences. **Ethiop Med Journal**, 40 (suplemento. 1): 37-49, 2002.

ALMEIDA, R. P.; Polymorphism of RNA gene it's of *Leishmania (V.) braziliensis* isolated from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 95 supl. II, p. 84, 2000.

ANTOINE, J. G. Biology of the interactions macrophages *Leishmania*. **Pathology. Biology. Paris**, v. 43: 215-23, 1995.

ANTOINE, J.G.; PRINA, E.; JOUANNE, C.; BONGRAND, P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*- infected macrophages maintain an acid pH. **Infection Immunity.**, v. 58: 779-87, 1990.

ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; LANG, T.; COURRET, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends Microbiology**, v. 7: 392-401, 1998

ARIAS, J. R.; NAIFF, R. D.; MILES, M. A.; De SOUZA, A.A.A The opossum, *Didelphis marsupialis* (marsupialia: Didephidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the amazon basin of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and hygiene**, v. 75(4): 537-541, 1985.

ARORA, K. S; SINHA, R.; SEHGAL, S. Use of in vitro method to assess different brands of anti-leishmanial drugs. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 180:21-27, 1991.

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*. **European Journal Immunology**, v. 24: 672-676, 1994.

AUGUSTO, O.; LINARES, E.; GIORGIO, S. Possible roles of nitric oxide and peroxynitrite in murine leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29:853-862, 1996.

BALESTIERI, F. M.; QUEIROZ, A. R.; SCAVONE, C.; COSTA, V. M.; BARRAL-NETO, M.; ABRAHAMSOHN, I. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes and Infection**, v. 4: 23-29, 2002.

BARRAL, A. M.; BARRAL-NETO, M.; YONG, E. C.; BRAWNELL, C. E.; REED, S. G. Transforming growth factor B as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90: 3442-3446, 1993.

BENJAMINI, E.; RICHARD, C.; GEOFFREY, S. **Imunologia**, Rio de Janeiro, Editora GUANABARA KOOGAN S. A., 4ª edição. 2002.

BOROVSKY, P. F. [On Sart Sore] *Voenno-Medicinskij Zurnal* (Military Medical Journal) part 195 (11), 76th year, 925-941 (in Russian), 1898.

BRANDONISIO, O.; PANARO, M. A.; SISTO, M.; ACQUAFREDDA, A.; LEOGRANDE, D.; FUMAROLA, L. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in dog infected with *Leishmania infantum*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 9-10, 2000.

BRITTINGHAM, A.; MORRISON, C. J.; McMASTER, W. R.; McGWIRE, B. S.; CHANG, K.; MOSSER, D. M. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion and resistance to complement-mediated lyses. **Journal Immunology**, v. 155: 3102-3111, 1995.

BRITTINGHAM, A.; MOSSER, D. M. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. **Parasitology Today**, v. 12: 444-447, 1996.

BOLETIM ESTATÍSTICO DA SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2002.

BURCHMORE, R. J. S.; BARRETT, M. P. Life in vacuoles- nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. **Journal Parasitology**, v. 31: 1311-1320, 2001.

CARINI, A.; PARANHOS, U. Identification de l'ulcère de Bauru avec le bouton d'orient. **Bulletin de la Societe Pathologie Exotique et de Filiales**, v.2, 225, 1909.

CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; COSTA, I. M.; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P. Clinical and imunopatological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56:315-25, 1994.

CHANG, K.P.; CHAUDHURI, G.; FOND, D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence, **Annual Review of Microbiology**, v. 44: 499-529, 1990.

CHILDS, G. E.; LIGHTER, L. K.; MCKINNEY, L. A. GROVES, M.; PRICE, E. HENDRICKS, L. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana* and *L. aethiopica*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** V. 78: 25-34.

CUNNINGHAM, D. D. On the presence of peculiar parasitic organisms in the tissue culture of a specimen of Delhi boil. **Scientific Memoirs by Medical Officers of the Army of India** 1, 21-31, 1885.

De SOUZA, W.; VANNIER- SANTOS, M. A. Early events in the process of *Leishmania*-macrophage interaction. In: **Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis**. TAPIA, FF. J.; CÁCERES-DITTMAR, G.; SANCHEZ, M. A. p. 49-70, 1996.

De SOUZA, A. A. A.; ISHIKAWA, E. A. Y.; BRAGA, E. E.; SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. *Psychodopygus complexus*, a new vector of *Leishmania braziliensis* to humans in Pará State, Brazil. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and hygiene**, **90**: 112-113, 1996.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: Epidemiology and public health aspects. **World Health Statistics Quarterly**, v. **45**: 267-275, 1992.

DESJOUX, P. Leishmaniasis: Public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, v. **14**: 417-423, 1996.

DEKREY, G. K.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infection Immunity**, v. **66**: 827-829, 1998.

DELORENZI, J. C.; ATTÍAS, M.; GATTASS, C. R.; ANDRADE, M.; REZENDE, C.; PINTO, A. C.; HENRIQUES, A. T.; BOU-HABIB, D. C.; SARAIVA, E. M. B. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. **45**: 1349-1354, 2001.

FALQUETO, A.; SESSA, P. A. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: **Tratado de Infectologia**. Veronesi, R. & Focaccia, R. (eds), V.2. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1997. p.1221-1233.

FUNASA/OMS. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, 2000. 62p.

GOMES, C.M.C.; MATTA, V.L.R.; OLIVEIRA, F.T.C.; SILVEIRA, F.T.; MONTEIRO, H.P.; OLIVEIRA, C.; OSTA, J.M.L. & CORBETT, C.E.P.. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: differences in the in vitro behavior among isolates from distinct clinical presentations of human cutaneous leishmaniasis. **Medicina, Buenos Aires**, **60** (supl.III): 71, 2000.

GOMES C.M.C., SILVEIRA, F.T. , COSTA, J.M.L, ARAI R.J., BRANDIZZI, L. MONTEIRO H.P; CORBETT C.E.P. 2002. Regulation of the expression of inducible nitric

oxide synthase and NO-resistance by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* isolated of different clinical forms of American Tegumentar Leishmaniasis. **Rev. Latinoamerican. Microbiol.** **44 (4)**, 2002.

GRIMALDI, G. JR.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, **6 (3)**: 230-250, 1993.

GRIMALDI, G. JR.; TESH, R. B.; McMAHON-PRATT. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. **41 (6)**: 687-725, 1989.

GRIMALDI Jr, G.; CÔRTE-REAL, S.; PINHO, R. T.; MORIATY, P. L. Interactions between *Leishmania mexicana mexicana* promastigotes and amastigotes and murine macrophages *in vitro*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. **78**: 135-146, 1983.

GRIMM, F.; BRUN, C.; JENNI, L. Promastigote infectivity in *Leishmania infantum*. **Parasitology Research**, v. **77**: 185-191, 1991.

GREEN, S. G.; MELTZER, N. S.; HIBBS, J. B.; NACY, C. A. Activated macrophage destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine dependent killing mechanism. **Journal Immunology**, v. **144**: 278-283, 1990.

GUIGUEMDE, R. T.; SAWADOGO, O. S.; BORIES, C.; TRAORE, K. L.; NEZIEN, D.; NIKIEMA, L. PRATLONG, F.; MARTY, P.; HOUIN, R.; DENIAU, M. *Leishmania major* and HIV co-infection in Burkina Faso. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **97(2)**: 168-9, 2003.

HAY, Q.; POPOV, V.; SOONG, L. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions *in vitro* and the priming of parasite-specific CD4⁺ T cells *in vivo*. **The Journal of Immunology**, v. **167**: 4534-4542, 2001.

HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. **Advances in Parasitology**, v. **44**: 1-37, 2000.

HILL, J.; NORTH, J.; COLLINS, F. M. Advantages of measuring changes in the number of viable parasites in murine models of experimental cutaneous leishmaniasis. **Infecty Immunology**, v. **39**:1087-94, 1983.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiological Reviews**, v. **59**: 533-547, 1995.

LAINSON, R. Epidemiologia e ecologia da leishmaniose tegumentar na Amazônia. **Hiléia Médica**, v. **3(1)**: 35-40, 1981.

LAINSON, R. Leishmaniasis. In: *Handbook Series in Zoonoses*. Steele J. H. (ed.), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, p. 41-103, 1982.

LAINSON, R. Leishmanial parasites of mammals in relation to human disease. Symposium of the Zoological Society of London, 50, 137-174.

LAINSON, R. The American leishmaniasis: Some observations on their ecology and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. **77**: 569-596, 1983.

LAINSON, R. Old World leishmaniasis. In: **Illustrated History of Tropical Diseases**. Manson, P.E.C. (ed), The Wellcome Trust, London, p.207-218, 1996b.

LAINSON, R. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à Região Amazônica do Brasil. **Revista Paraense de Medicina**, v. **11(1)**: 29-40, 1997.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmania and leishmaniasis of the new world with reference to Brazil. **Bulletin of Pan-Americam Heath Organization**, **7(4)**: 1-19, 1973.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v. **273**: 595-599, 1978.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis In: *Biology of the Kinetoplastida* (LUMSDEN, W.H.R. & EVANS, D.A., Eds) p. 1-116. London. Academic Press. 1979.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evaluation, classification and geographical distribution. In: **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, W. Peters & Killick- Kindrick (eds). London, Academic Press, p. 1-120, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. *Leishmania (V.) naiffi* sp. N., A parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* *Leishmania* in Amazonian Brazil. **Annales de Parasitologie Humaine Comparee**, v. **64** (1): 3-9, 1989.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Journal of the Brazilian Association for the advancement of Science**, **44**: 94-106, 1992.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis-The Neotropical *Leishmania* species. In: TOPLEY & WILSON **Microbiology and Microbial Infections** (Ed. F. E. G. Cox), v. 5, cap. 13: 241-266, 1998.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; WARD R. D.; READY, P. D.; NAIFF, R. D. Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in North Pará State. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. **73**: 239-242, 1979.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R.; ISHIKAWA, E. A. Y. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson & Shaw, 1989. **Annales de Parasitologie Humaine Comparee**, v. **65**: 282-284, 1990.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; De SOUZA A. A. A.; BRAGA, R. R.; ISHIKAWA, E. A. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonian. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **89** (3): 435-443, 1994.

LIEW, F. Y.; O'DONNELL, C. A. Immunology of Leishmaniasis. **Advance Parasitology**, v. **32**: 161-259, 1993.

LIEW, F. Y.; MELLOTT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R. M.; MONACADA, S. Macrophages killing of *Leishmania* parasites in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of Immunology**, v. 44: 4794-97, 1990a.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MOSS, D.; PARKINSON, C.; ROGERS, M. V.; MONCADA, S. Resistance to *Leishmania* major infection correlates with the induction of oxid synthase in murine macrophage. **European Journal of Immunology**, v. 21: 3009-14, 1991.

LIEW, F. Y.; PARKINSON, C.; MELLOTT, S.; SEVERN, A.; CARRIER, M. J. Tumor necrosis factor (TNF α) in *Leishmaniasis*. **Immunology**, v. 69: 570-573, 1990b.

LEISHMAN, W.B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **Br. Med. J.** v. 1: 1252-1254, 1903.

LINDENBERG, A. A úlcera de Bauru e seu micróbio. **Revista de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.** v. 12: 116-120, 1909.

LOUASSINI, M.; ADROHER, F. J.; FOULQUIE, M. R.; BENITEZ, R. Investigations on the *in vitro* metacyclogenesis of a visceral and a cutaneous human strain of *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, v. 70(3): 355-368, 1998.

LUCAS, C. M.; FRANKE, E. D.; CACHAY, M. I.; TEJADA, A.; CRUZ, M. E.; KREUTZER, R. D.; BARKER, D. C.; McCANN, S. H.; WATTS, D. M. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis case in Peru. **American Journal Medicine and Hygiene**, v.59 (2), p.312-17, 1998.

LUCAS, C.M.; FRANKE, E.D.; CACHAY, M.I.; TEJADA, A.; CARRIZALES, D.; KREUTZER, R. D. *Leishmania (Viannia) lainsoni*: first isolation in Peru. **American Journal of Topical Medicine and Hygiene**, v. 51 (5): 533-537, 1994.

MACMICKING, J.; XIE, Q-W, NATHAN, C.F. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology** 15: 323-350, 1997.

MADEIRA, M. F.; BARBOSA-SANTOS, E. G. O.; MARZOCHI, M. C. A. Experimental infection of canine peritoneal macrophages with visceral and dermatotropic *Leishmania* strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94(5): 645-648, 1999.

MARSDEN, P.D. Current concepts in Parasitology. **The New England Journal of Medicine**, v. 300 (7): 350-352, 1979.

MARSDEN, P. D. Cutaneous leishmaniasis of the New World. In: Cecil Textbook of Medicine. Wyngaarden, J.B.& Smith, L.L.H. (eds). 16^a ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, p. 1632-1634, 1982.

MARSDEN, D.D. Mucosal leishmaniasis ("espundia"/Escomel, 1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80: 859-76, 1986.

MARSDEN, P. D.; LLANOS-CUENTAS, E. A.; LAGO, E. L.; CUBA, C. C. BARRETO, A.C.; COSTA, J.M.; JONES, T.C. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços Bahia-Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. III. Mucosal disease presentation and initial evolution. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 17: 179-186, 1984.

MARTINEZ, E.; LE PONT, F.; MOLLINEDO, S. CUPOLILLO, E. A first case of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Bolivia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.95 (4): 375-7, 2001.

MARZOCHI, M.A.C.; MARZOCHI, K.B. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil- emerging antroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10(2): 325-329, 1994.

MATTA, A. A DE. Sur les leishmanioses tégumentaires. Classification générale des leishmanioses. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de Ses Filiales** 9, 494-503, 1916.

MAUEL, J.; RANSIJN. A *Leishmania* spp.: Mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. **Experimental Parasitology**, v. 87: 98-111, 1997.

MÉNDEZ, S.; NELL, M.; ALUANDA, J. M. *Leishmania infantum*: infection of macrophage in vitro with promastigotes. **International Journal for Parasitology**, v. 26(6): 619-622, 2000.

MENTINK, M. K.; MOSSER, D. M. **Current Opinion in Hematology**, v. 7: 26-31, 2000.

MOSSALAYI, M. D.; MAZIER, A. D.; VINCENDEAU, P. & VOLDOKIS, I. The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. **Parasitology Today**, v. 15: 342-345, 1999.

MOSSER, D.M.; BURKE, S. K.; CONTAVAS, E. E.; WEDGWOOD, J. F.; EDELSON, P. J. *Leishmania* species: mechanisms of the complement activation by five strains of promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 62: 394-404, 1986.

MUÑOZ, V.; MORETTI, C.; SAUVAIN, M.; CARON, C.; PORZEL, A.; MASSIOT, G.; RICHARD, B.; LE MEN-OLIVIER, L. Isolation of bis-indole alkaloids with antileishmanial and bacterial activities from *Peschiera van heurkii*. **Planta Médica**, v. 60: 445-459, 1994.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. Elements of host protective response. In: **Medical Microbiology**. 3rd ed., p.80, 1998.

NAIFF, R.D.; FREITAS, R. A. NAIFF, M. F.; ARIAS, J. R.; BARRET, T. V.; MOMEN, H.; GRIMALDI, JR. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 86 (3): 317-321, 1991.

NAIFF, R.D.; TALHARI, S.; BARRELA, T.V. Isolation of *leishmania (V.) guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. **Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz**, v.83, p.529-530,1998.

OLIVIER, M. Modulation of host cell intracellular Ca^{2+} **Parasitology Today**, **12**: 145-50 1996.

PANARO, M. A.; ACQUAFREDDA, A.; LISI, S.; LOFRUMENTO, D. D.; TROTA, T.; SATALINO, R.; SACCIA, M.; MITOLO, V.; BRANDONISIO, O. Inducible nitric oxide syntase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*- infected human macrophages stimulated with interferon-gama and bacterial lipopolysaccharide. **International Journal Clinical Lab Research**, **29 (3)**: 122-127, 1999.

PINELLI, E.; GEBHARD, D.; MOMMAAS, A. M.; VAN HOEIJ, M.; LANGERMANS, J. A.; RUITENBERG, E. J.; RUTTEN, V. P. Infection of canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric production and anti-leishmanial activity. **Veterianry Parasitology**, **92(3)**: 181-189, 2000.

PIÑERO, J.; MARTINEZ, E.; PACHECO, R.; ARAGÓN, Z.; De ARMAS, F.; DEL CASTILLO, A.; VALLADARES, B. PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. **73**: 21-29, 1999.

PUENTES, S.M.; Da SILVA, R. P.; SACKS, D. L.; HAMMER, C. H. & JOINER, K. A. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. **Journal of Immunology**, v. **145**: 4311-4316, 1989.

REINER, S.L.; LOCKSLEY, R.M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annual Review Immunology**, v. **13**: 151-77, 1995.

REY, L. *Leishmania* e Leishmaniose: Os Parasitas. **In: Parasitologia**. 3^a ed., Rio de Janeiro, RJ, p 214-221, 2001.

REY, J. A.; TRAVI, B. L.; VALENCIA, A. Z.; SARAVAIVA, N. G. Infectivity of subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex *in vivo* and *in vitro*. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v.43 (6): 623-631, 1990.

RITTING, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today**, v. 16: 292-297, 2000.

ROBERTS, W. L.; BERMAN, J. D.; RAINEY, P. M. *In vitro* antileishmanial properties of tri and pentavalent antimonial preparations. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v. 39: 1234-1239, 1995.

ROCHA, J. C. S. **Envolvimento do óxido nítrico na artrite induzida por zymosan em ratos**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. Ceará. 1999. 129p.

ROCHA, J. C. S.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F. A. C. Óxido Nítrico: Biossíntese, metabolismo e funções. **Revista Paraense de Medicina**, 16(2): 38-45, 2002.

ROSS, RONALD. (1) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and (2) further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal** 2, 1261, 1401.

ROSEN, G. M.; POU, S.; RAMOS, C.L.; COHEN, M.S.; BRITIGAN, B.E. Free radicals and phagocytic cells. **Faseb Journal**, v. 9: 200-209, 1995.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v. 223: 1417-1419, 1984.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Development of infective stage of *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sandflies. **American Journal Medicine and Hygiene**, v. 34: 456-459, 1985.

SACKS, D. L.; BROCLIN, T. N.; TURCO, S. J. Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. **Molecular Biochemical Parasitology** V. 42: 225-34, 1990.

SANTRICH, C.; SEGURA, I.; ARIAS, A.L. SARAIVA, N.G. Mucosa disease caused by *leishmania braziliensis guyanensis*. **American Journal Medicine and Hygiene**, v. 42: 51-55, 1988.

SAVOIA, D.; VULCANO, F. BIGLINO, S.; ZUCCA, M. Evaluation of different assay techniques to assess the interaction between *Leishmania major* and *Leishmania infantum* promastigotes. **Microbios**, v. 66: 73-81, 1991.

SEAY, M. B.; HEARD, P. L.; CHAUDHURI, G. Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. **Infectious Immunology**, 64: 5129-5137, 1996.

SHORTT, H. E.; BARROUD, P. J.; CRAIGHEAD, A. C. The life history and morphology of herpetomonas Donovan in the sandfly, *Phlebotomus argentipes*. **Indian Journal of Medical Research** 13, 947-959, 1926.

SILVEIRA, F.T.; **Patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana: Caracterização Clínica, Histopatológica e Imunopatológica da Leishmaniose Cutânea Disseminada, com ênfase na doença causada pela *Leishmania (L.) amazonensis***. São Paulo, 2001. 181f. Tese (Doutorado em Medicina)- Universidade de São Paulo (FMUSP).

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**, v. 9: 43-50, 2002.

SILVEIRA, F.T.; SHAW, J.J.; BRAGA, R.R. & ISHIKAWA, E.A. Dermal leishmaniasis in the Amazon Region of Brazil: *Leishmania (V.) lainsoni* sp n, a new parasite from the state of Pará. **Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz**, **82**: 289-292, 1987.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; SHAW, J.J.; BRAGA, R. R.; ISHIKAWA, E. A.; SOUZA, A. A. A. Leishmaniose cutânea na Amazonia: isolamento de *Leishmania (V.) lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Rodentia: Dasyprctidae), no estado do Pará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. **33** (1): 18-22, 1991.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; DE BRITO, A. C.; OLIVEIRA, M. R. F.; PAES, M. G.; DE SOUZA, A. A. A.; DA SILVA, B. M. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Leão, R.N.Q. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico**. Belém: Editora CEJUP, p.619-30, 1997.

SOARES, M. B. P.; DAVID, J. R.; TITUS, R. G.; An *in vitro* model for infection with *Leishmania major* that mimics the immune response in mice. **Infection Immunity**, v. **65**: 2837-2845, 1997.

SODRÉ, R. N.; ISHIKAWA, E. A.; PIRES, R. N.; SILVEIRA, F. T. XXXVIII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 330., 2002., Foz do Iguaçu, livro de resumos, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. **35** (suplemento I), 2002.

STRANGWAY-DIXON, J. AND LAINSON, R. Dermal leishmaniasis in British Honduras: transmission of *L. braziliensis* by Phlebotomus species. **British Medical Journal** **1**, 297-299, 1962.

TALHARI, S.; TALHARI, A. C.; FERREIRA, L.C. D.E.L.; NAIFF, R. Leishmaniose cutaneomucosa. N: TALHARI, S.; NEVES, R. G. **Dermatologia Tropical**. Ed. Medsi, 1995, p.23-45.

VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (nota preliminar). **Brasil-Médico** **25**, 411.

VOULDOUKIS I.; RIVEROS-MORENO, V.; DUGAS, B.; OUAZ, F.; BECHEREL, P.; DEBRE, P.; MONCADA, S.; MOSSALAYI, M. D. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. **92** (17): 7804-7808, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Leishmaniasis**. WHO Technical Report Series 793p. 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION 1998. "World Health Organization, Division of control of Tropical Disease: Leishmaniasis Control" www.who.int/ctal/html/leisburtre.html

ZAKAI, H. A.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. *In vitro* stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. **Parasitology**, v. **116** (4): 305-309.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Pssychodidae). **Memories of the American Entomological Institute number**, **54**: 1-181, 1994.

