



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

**DETECÇÃO DA ATIVIDADE E IMUNOLocalização DA ENZIMA ÓXIDO
NÍTRICO SINTASE EM *Leishmania (Leishmania) amazonensis* E *Leishmania
(Viannia) braziliensis*.**

RODRIGO RIBEIRO FURTADO

**BELÉM - PA
2014**

**DETECÇÃO DA ATIVIDADE E IMUNOLocalIZAÇÃO DA ENZIMA ÓXIDO
NÍTRICO SINTASE EM *Leishmania (Leishmania) amazonensis* E *Leishmania
(Viannia) braziliensis*.**

RODRIGO RIBEIRO FURTADO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular (PPNBC) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA), como requisito para obtenção do grau de mestre em Neurociências e Biologia Celular.

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

**BELÉM - PA
2014**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Furtado, Rodrigo Ribeiro, 1987-
Detecção da atividade e imunolocalização da enzima
óxido nítrico sintase em leishmania (leishmania)
amazonensis e leishmania (viannia) braziliensis. /
Rodrigo Ribeiro Furtado. - 2014.

Orientadora: Edilene Oliveira da Silva.
Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal do Pará, Instituto de Ciências
Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2014.

1. Leishmania. 2. Óxido nítrico. 3.
Leishmania braziliensis. 4. Relação
hospedeiro-parasito. I. Título.

CDD 22. ed. 579.4

**DETECÇÃO DA ATIVIDADE E IMUNOLocalIZAÇÃO DA ENZIMA ÓXIDO
NÍTRICO SINTASE EM *Leishmania (Leishmania) amazonensis* E *Leishmania
(Viannia) braziliensis*.**

RODRIGO RIBEIRO FURTADO

Orientadora: **Prof^a Dr^a Edilene Oliveira da Silva.**
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular (PPNBC) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA), como requisito para obtenção do grau de mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Membro: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Membro: Prof^a. Dr^a. Barbarela de Matos Macchi
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Suplente: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Belém (PA), 31 de Outubro de 2014.

Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos.
Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que
fazemos de nós.

(Chico Xavier)

Dedico a Deus em primeiro lugar por ter me conduzido a este caminho;
Dedico à minha família, a base de todas as minhas conquistas;
Dedico à minha família acadêmica e profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre me iluminar e ter me conduzido ao caminho do sucesso.

Agradeço a minha família, minha mãe Mary, meu Pai Benedito, meu irmão Carlos e minha irmã Catarina pelo incentivo, apoio e carinho em todos os momentos da minha vida. Por acreditarem em mim, por terem investido em mim. Esta conquista é nossa!

À Prof^a. Dr^a. Edilene Oliveira, pela confiança, pelo incentivo, pela orientação, pelo carinho, pela oportunidade de me proporcionar o crescimento profissional. Professora, por você ter me aceito na sua equipe de trabalho, hoje eu consigo trilhar meu caminho. Acredito que esta seja a maior missão de um professor, conduzir seus alunos ao sucesso na vida. A você o meu **MUITO OBRIGADO!**

À todos os integrantes do Laboratório de Protozoologia e Biologia estrutural:

Ana e Luis, agradeço a vocês a enorme contribuição para o meu trabalho e para minha formação. Sempre dispostos a ensinar e colaborar para o andamento dos trabalhos. Vocês são peças fundamentais na família LAB. Sem vocês a realização deste trabalho não seria possível. Muito obrigado!

Amandinha, Raquel e Eliane foram as alunas da professora Edilene que me receberam e que me ensinaram sobre as coisas mais importantes do laboratório, a conduta de trabalho, sobre os princípios da coletividade, com vocês eu aprendi a ter tolerância e respeito no ambiente de trabalho. Agradeço ao Davi que também me recebeu com muita atenção no LAB. A convivência com vocês foi muito valiosa para mim. Obrigado por terem me acolhido e por terem me ensinado muito daquilo que pratico hoje em dia, o exercício do trabalho em equipe.

Fernanda é uma parceira de trabalho que era tão novata quanto eu em 2009, aprendemos juntos, errando e acertando muitas vezes. Fernanda não mede esforços pra ajudar nossa equipe nos trabalho do LBE. Sempre prestativa e afetuosa, muito obrigado pelas suas inúmeras contribuições!

Depois chegou ao LAB uma pessoa de extremo carisma, generosidade e simplicidade, uma pessoa que chegou sem saber nada, que eu pude testemunhar o seu crescimento e hoje tenho o prazer da sua amizade, Josineide você nos inspira em fazer o bem e sermos pessoas transformadoras como você.

A família do LAB continuou crescendo e logo depois chegou a dupla inseparável Bruno e Paula. Bruno sempre muito prestativo e determinado, uma pessoa que aprendeu muito rápido como se tornar um pesquisador. Quem diria ein Bruno? Ontem a gente estava te ensinando e hoje é você quem nos ensina. Agradeço muito a você pelas várias contribuições.

A Paula Frade é uma pessoa diferenciada, muito meiga e solidária. É a nossa irmã chorona, com coração de ouro. Paula você nos deu muitos momentos de alegria, sua bondade interior transparece em seus atos. Agradeço por você fazer parte deste trabalho também, sempre teremos galhos pra quebrar e muitos DAPIs pra diluir (Hahaha).

Logo em seguida chegou a Carol, uma pessoa muito verdadeira, muito autêntica, com muita personalidade. Com você aprendi a persistir em minhas determinações, meus anseios. Agradeço sua companhia e suas contribuições.

Lienne e Jorge, agradeço a vocês pelo companheirismo, pelas conversas, pelos momentos bons que tivemos juntos. Lienne minha parceira de mestrado, uma pessoa muito amiga e generosa. Sua alegria é contagiante, foi muito bom ter sua companhia nestes anos. Jorge com sua irreverência e alegria deixam os momentos de descontração sempre mais aprazíveis.

Evelen e Sandro chegaram juntos a família LAB, vocês se tornaram pessoas muito queridas, muito parceiras. Agradeço a cada um de vocês pelos momentos que passamos juntos.

Ao Instituto Evandro Chagas, pelo fornecimento das cepas de *Leishmania* usadas neste trabalho. Ao IEC também por ter me proporcionado uma segunda família LAB. Lá conheci pessoas excepcionais, pessoas de enorme coração que me acolheram e me fizeram sentir bem neste novo ambiente de trabalho. Pessoas que contribuem constantemente para minha formação, não só profissional. Vocês serão sempre meus manos de coração.

Ao professor Dr. Chubert, pela ajuda em padronizar alguns testes.

À CAPES e INBEB, pelo apoio financeiro durante a realização dessa pesquisa.

Aos Membros da banca Dr^a. Barbarela e Dr. Marcelo Bahia, por terem aceitado participar contribuindo com este trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Neurociências e Biologia Celular.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

As leishmanioses são protozoonoses causadas por parasitos do gênero *Leishmania* e estão distribuídas por diversas partes do mundo. Essa patologia se manifesta sobre diversas formas clínicas: Leishmaniose visceral (LV), Leishmaniose cutânea (LC) e Leishmaniose cutaneomucosa (LM). O parasito *Leishmania* apresenta duas formas evolutivas: a forma promastigota, de vida livre, e a forma amastigota, intracelular obrigatório, presente principalmente nas células fagocíticas mononucleadas. A inibição do crescimento ou destruição dos parasitos dentro da célula hospedeira é um mecanismo fundamental para erradicar a infecção. A inibição dos efeitos leishmanicidas do macrófago parece estar relacionada com a capacidade de algumas espécies em inibir a produção de óxido nítrico (NO). Estudos recentes têm mostrado que algumas espécies de *Leishmania* possuem a capacidade de produzir NO a partir de uma forma constitutiva da enzima Óxido Nítrico Sintase (cNOS). Este trabalho tem como objetivo detectar e localizar a enzima cNOS presente em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Para isto, o presente estudo utilizou citometria de fluxo, a qual permitiu quantificar a produção de NO nos parasitos, evidenciando a maior atividade da enzima cNOS em *Leishmania (L.) amazonensis* quando comparada com a espécie *Leishmania (V.) braziliensis*. Foi realizada a imunomarcagem das formas promastigotas com o anticorpo anti-cNOS para observar a localização ultraestrutural da enzima por microscopia eletrônica de transmissão (MET), posteriormente a co-marcagem com os anticorpos anti-cNOS e anti-GAPDH para confirmar a provável compartimentalização desta enzima em organelas glicossomais. Os resultados sugerem que a produção de NO por diferentes espécies de *Leishmania* é um processo localizado em organelas glicossomais com a captura do aminoácido L-arginina da célula hospedeira, o sequestro deste substrato priva o hospedeiro de sintetizar o NO exógeno danoso ao parasito. Esta modulação sugere mais um mecanismo de escape que os protozoários tripanossomatídeos apresentam durante a complexa interação parasito-hospedeiro.

Palavras chave: *Leishmania (L.) amazonensis*; *Leishmania (V.) braziliensis*; óxido nítrico sintase; óxido nítrico.

ABSTRACT

The Leishmaniasis is an infectious disease caused by parasites of the *Leishmania* genus and are distributed in different parts of the world. This pathology manifests in several clinical forms: Visceral leishmaniasis (VL), cutaneous leishmaniasis (CL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL). The *Leishmania* parasite presents two evolutionary forms: promastigote form, free life parasite, and amastigotes, intracellular binding, present mainly in the mononuclear phagocytic cells. The growth inhibition or destruction of parasites within the host cell is an essential to break the infection mechanism. Inhibition of macrophage leishmanicidal effect appears to be related to the ability of some species to inhibit the nitric oxide (NO) production. Recent studies have shown that some species of *Leishmania* have the ability to produce NO by the constitutive form of nitric oxide synthase (cNOS). This work aims to detect and locate the cNOS enzyme present in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. For this reason, this study used flow cytometry, which allowed to quantify NO production in parasites, indicating the increased activity of the cNOS enzyme in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* compared with *Leishmania (Viannia) braziliensis* species. We performed immunostaining of promastigotes with anti-cNOS antibody to watch the ultrastructural localization of the enzyme by transmission electron microscopy (TEM), then co-labeling with anti-cNOS and anti-GAPDH antibody to confirm the probable compartmentalization this enzyme in glycosomal organelles. The results suggest that NO production by different strains of *Leishmania* is a process located in the glycosomal organelles capturing L-arginine from the host cell, the substrate depletion deprives the host to synthesize the harmful exogenous NO to the parasite. This modulation suggests another escape mechanism that trypanosomatid protozoa present in the complex host-parasite interaction.

Key words: *Leishmania (L.) amazonensis*; *Leishmania (V.) braziliensis*; nitric oxide synthasis; nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Formas evolutivas dos protozoários do gênero *Leishmania*.....2
- Figura 2:** Representação do ciclo biológico da leishmaniose tegumentar americana (LTA) evidenciando o homem como hospedeiro acidental..... 3
- Figura 3:** Mapa mostrando a incidência da LTA por unidade federativa nos países da América latina (A). Gráfico da taxa de incidência da LTA comparando a média nacional com a taxa de incidência no Estado do Pará (B). 7
- Figura 4:** Espectro clínico e imunológico da LTA destacando os pólos de reatividade e as formas clínicas causadas pelas espécies *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis* 9
- Figura 5:** Desenho esquemático da reação química de síntese do óxido nítrico 12
- Figura 6:** Citometria de fluxo para quantificação da produção de óxido nítrico..... 22
- Figura 7:** Microscopia de fluorescência mostrando a produção de óxido nítrico em promastigotas marcadas com DAF-FM..... 22
- Figura 8:** Imunofluorescência indireta de *Leishmania (L.) amazonensis* marcadas com anti-cNOS e anti-GAPDH para a co-localização destas duas enzimas em compartimentos glicossomais..... 24
- Figura 9:** Imunofluorescência indireta de *Leishmania (V.) braziliensis* marcadas com anti-cNOS e anti-GAPDH mostrando a co-localização da enzima cNOS em organelas glicossomais. 25
- Figura 10:** Imunomarcção da enzima cNOS por microscopia eletrônica de transmissão em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* 27
- Figura 11:** Imunomarcção da enzima cNOS em promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*..... 29

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BSA – Sigla inglesa para soro albumina bovina
B.O.D - *Biological Oxygen Demand*
Ca²⁺ - Íon cálcio
CAT – Transportador de aminoácidos catiônicos
CR1 e CR3 – Receptores para C3b do complemento
C3b – Molécula do sistema complemento
DAF-FM – 4-Amino-5-Metilamino-2',7'-Difluorofluoresceína
DAF2DA – 4,5 Diaminofluoresceína diacetato
DNA – Ácido desoxirribonucléico
GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GPPS – Glutamina-Piruvato-Penicilina-Streptomicina
GP63 – Glicoproteína de superfície de 63kDa
IL- Interleucina
IgG – Imunoglobulina G
IgE – Imunoglobulina E
IP - Iodeto de Propídio
IMF – Intensidade média de fluorescência
INF- γ – Interferon γ
Kg – Quilograma
LC – Leishmaniose cutânea
LCDB – Leishmaniose cutânea disseminada Borderline
LCAD – Leishmaniose cutânea anérgica difusa
LCL – Leishmaniose cutânea localizada
LMC – Leishmaniose mucocutânea
LPG - Lipofosfoglicano
LPS – Lipopolissacarídeo
LTA – Leishmaniose tegumentar americana
LV – Leishmaniose visceral
M – Molar
mM - Milimolar
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
Mn²⁺ - Íon manganês

$\mu\text{g/mL}$ - Microgramas por mililitros
 μL – Microlitros
 μm – Micrômetros
mg – Miligramas
nm – Nanomêtro
 NH_4Cl – Cloreto de amônia
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase hidrogenase
NNN – Neal, Novy e Nicolle
NOS – Óxido nítrico sintase induzida
NO – Sigla inglesa para Óxido nítrico
 NO^{3-} - Nitrato
 NO^{2-} - Nitrito
OMS – Organização mundial da Saúde
PBS – Sigla inglesa para Tampão Fosfato Salino
PCR – Proteína C reativa
PCR – Reação em cadeia da polimerase
pH – Potencial hidrogeniônico
PHEM – Solução tamponada contendo PIPES, HEPES, EGTA e magnésio
rpm – Rotações por minuto
ROS – Radicais de oxigênio
RPMI – Roswell Park Memorial Institute
SBF – Soro Bovino Fetal
 $\text{TNF-}\alpha$ – Fator de necrose tumoral
 $\text{TGF-}\beta$ – Fator de transformação do crescimento
 O_2 – Oxigênio molecular
 O^{2-} – Aniôn superóxido
 $^\circ\text{C}$ – graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O PARASITO.....	1
1.2 O CICLO EVOLUTIVO	2
1.3 INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO	4
1.4 LEISHMANIOSE.....	6
1.4.1 Leishmanioses causadas por <i>Leishmania. (L.) amazonensis</i>	7
1.4.2 Leishmaniose causada por <i>Leishmania. (V.) braziliensis</i>	8
1.5 RESPOSTA MICROBICIDA	10
1.6 ÓXIDO NÍTRICO E ÓXIDO NÍTRICO SINTASE	12
1.7 A ENZIMA ARGINASE E OS GLICOSSOMOS.....	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVOS GERAIS	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DE PROMASTIGOTAS	18
3.2 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	18
3.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	19
3.4 IMUNOLOCALIZAÇÃO DA ENZIMA cNOS	19
4 RESULTADOS	21
4.1 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	21
4.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	23
4.3 IMUNOLOCALIZAÇÃO DA ENZIMA cNOS	26
5 DISCUSSÃO	29
6 CONCLUSÕES.....	33

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são protozoonoses causadas por parasitas digenéticos da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e estão distribuídas por diversas partes do mundo. A Leishmaniose pode apresentar uma variedade de formas clínicas cutâneas, bem como a forma mucocutânea e a leishmaniose visceral. A doença está presente em vários continentes, sendo endêmica em vários países da América latina e representa um sério problema de saúde pública para o Brasil. A leishmaniose é transmitida no momento do repasto sanguíneo das fêmeas de diversas espécies de flebotomíneos, os quais introduzem no hospedeiro vertebrado as formas promastigotas (MAGILL, 1995).

1.1 O PARASITO

Os parasitos do gênero *Leishmania* são protozoários da ordem Kinetoplastida, apresentam uma condensação de DNA extranuclear na mitocôndria denominada cinetoplasto. Este gênero caracteriza-se por apresentar duas formas evolutivas em seu ciclo biológico: a forma amastigota, que é intracelular obrigatória e desenvolve-se no interior de células fagocíticas dos hospedeiros, e a forma promastigota que se desenvolve no tubo digestivo dos hospedeiros invertebrados.

As formas amastigotas são arredondadas ou ovóides e medem, dependendo da espécie, de 3 a 6 μm de comprimento. É encontrada *in vivo* em tecidos humanos e de vertebrados sensíveis à inoculação do parasito ou *in vitro* em meios de cultura à 35C°. As formas promastigotas são alongadas, 10 a 15 μm de comprimento, apresentam flagelo externalizado e cinetoplasto anterior ao núcleo; podem ser encontradas no tubo digestivo de flebotomíneos ou *in vitro* nos meios de cultura à 25C° (Fig. 1).

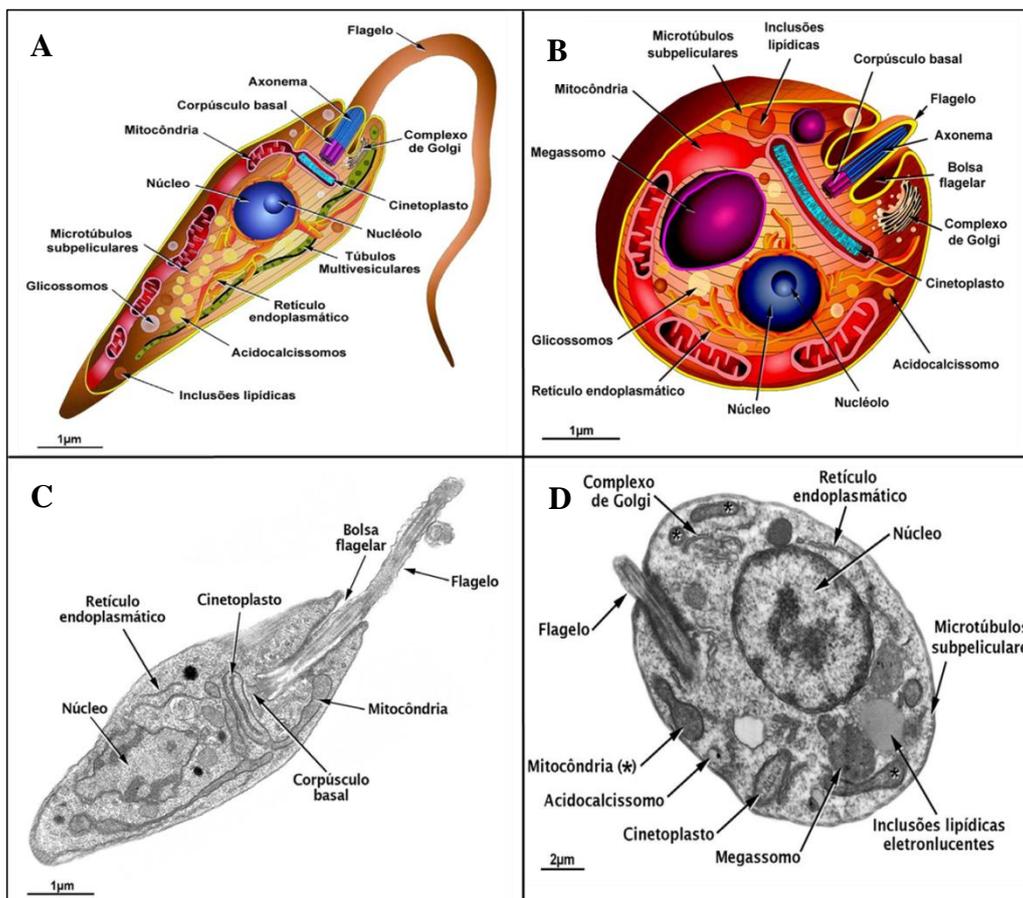


Figura 1. Formas evolutivas dos protozoários do gênero *Leishmania*. Em A e B, representação esquemática das formas promastigota (A) e amastigota (B) mostrando sua organização celular. Em C e D podemos observar por microscopia eletrônica de transmissão as mesmas formas evolutivas (TEIXEIRA et al., 2013).

1.2 O CICLO EVOLUTIVO

As leishmanioses são transmitidas por invertebrados dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*. O ciclo evolutivo do parasito (Figura 2) se inicia quando as fêmeas realizam o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, ingere formas amastigotas que se fixam no intestino médio do hospedeiro invertebrado. Neste local os protozoários sofrem modificações, tornando-se promastigotas procíclicas não-infectivas. Posteriormente, no epitélio do trato digestivo do vetor, sofrem um processo de metaciclogênese e tornam-se promastigotas metacíclicas, infectivas para os hospedeiros

mamíferos, especialmente para as células fagocíticas da imunidade inata (SACKS, 2001; PINTO-DA-SILVA et al., 2002).

No hospedeiro mamífero, as formas promastigotas são internalizadas por fagócitos profissionais no local da inoculação, principalmente por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (VAN ZANDBERGEN et al., 2002; RIBEIRO-GOMES et al., 2004). Já no ambiente intracelular, as formas promastigotas sofrem outras modificações, assumindo formato arredondado e com flagelo internalizado, características da forma amastigota. Esta forma de vida é capaz de se multiplicar no interior do vacúolo parasitóforo da célula hospedeira, sendo posteriormente, liberadas para que possam infectar outras células fagocíticas (GREGORY; OLIVIER, 2005).

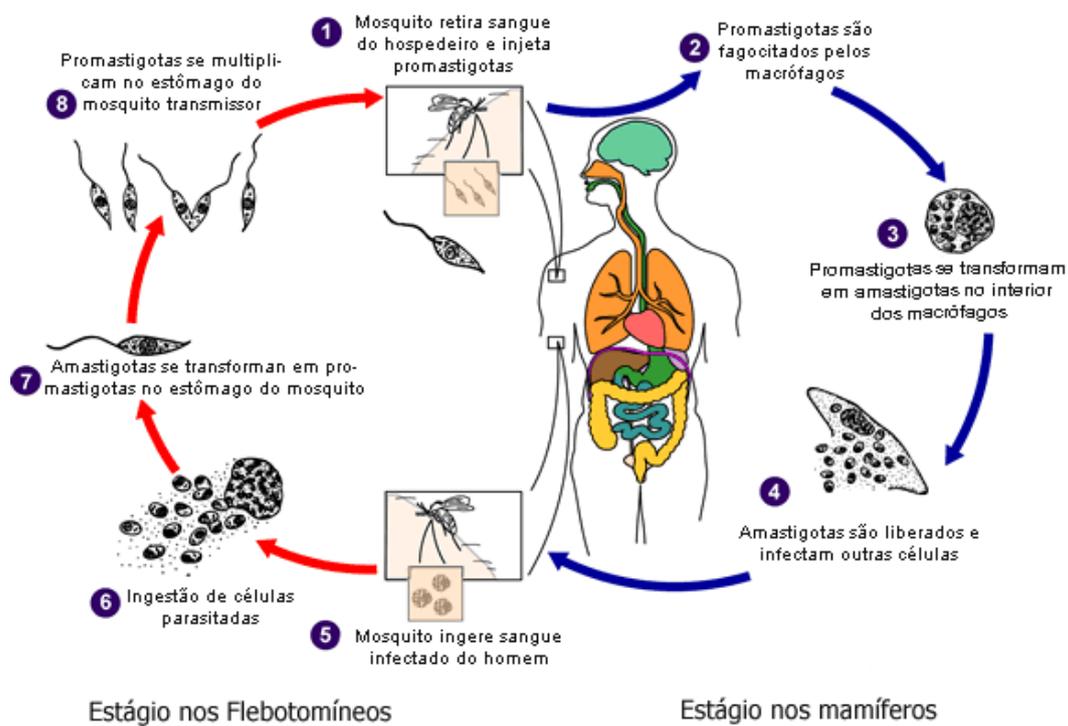


Figura 2. Figura esquemática do ciclo biológico da leishmaniose evidenciando o estágio de desenvolvimento do protozoário no hospedeiro vertebrado e invertebrado (Global Health – Division of parasitic diseases and malaria, 2013. Com adaptações).

1.3 INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

A entrada do parasito *Leishmania* na célula hospedeira é determinada por uma complexa associação dos fatores de virulência do parasito, com os mecanismos da imunidade inata do hospedeiro vertebrado. Os processos que medeiam a interação parasito-hospedeiro são decisivos para o ciclo evolutivo do protozoário, bem como para o perfil clínico que a infecção irá estabelecer (WHO, 2010).

Este processo inicia-se com o reconhecimento do parasito através de receptores presentes na membrana dos macrófagos. O reconhecimento ocorre, principalmente, via receptores para o complemento CR1 e CR3 (AMBROSIO; DE MESSIAS-REASON, 2005). A internalização dos protozoários também pode utilizar receptores de manose e da proteína C reativa. Além disso, receptores na superfície de macrófagos, específicos para o fosfolípido fosfatidilserina, são igualmente importantes para o reconhecimento de parasitos do gênero *Leishmania* (VAN ZANDBERGEN et al., 2006). A exposição da fosfatidilserina por promastigotas de *Leishmania* pode funcionar como um ligante para a superfície dos macrófagos, garantindo a internalização do parasita e a sua infectividade (FARIAS et al., 2013).

Neutrófilos e células dendríticas dérmicas são as primeiras células a interagir com os parasitos após a inoculação pelo vetor. No entanto, não representam ambientes propícios para a replicação e sobrevivência do parasito em longo prazo. Macrófagos residentes da derme também são rapidamente infectados, tornando-se a maior população de células infectadas após 24 horas (PETERS, 2008).

O protozoário *Leishmania* é considerado um parasito intracelular obrigatório para macrófagos, mas estudos recentes relataram que estes parasitos apresentam, também, afinidade por outros tipos celulares tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Em neutrófilos e células dendríticas derivadas de monócitos a infecção pelo protozoário *Leishmania* já é bem descrita (VAN ZANDBERGEN et al., 2004; KAYE; SCOTT, 2011), além destes fagócitos foi mostrado também infecção em fibroblastos (BOGDAN et al., 2000 A).

A constatação de que o protozoário *Leishmania* pode sobreviver em diversas populações de fagócitos, com diferentes propriedades microbicidas, sugere a diversidade dos fatores de virulência e mecanismos de escape que o parasita desenvolveu ao longo do seu processo evolutivo e adaptativo.

Para que ocorra o estabelecimento da infecção, os parasitos do gênero *Leishmania* desenvolveram uma série de mecanismos que subvertem o potencial microbicida das células do sistema imune dos mamíferos. Dentre os principais fatores de virulência estão a protease GP63 e o lipofosfoglicano (LPG). A GP63 é uma protease que atua protegendo o parasito da ação lítica do sistema complemento, desta forma impede a formação do complexo de ataque à membrana pela clivagem da cascata das convertases (LINA et al., 2011). Algumas espécies de *Leishmania* utilizam a GP63 para converter o C3b ativo em C3bi inativo, assim favorece a opsonização por moléculas inativas do sistema complemento, então sua internalização na célula hospedeira ocorre via receptor CR3 e não CR1, logo sua fagocitose não irá acionar mecanismos do *burst* oxidativo.

O LPG é a macromolécula mais abundante na membrana dos parasitos *Leishmania*, que forma uma camada espessa de glicocálix conferindo ao parasito a proteção contra a fixação do complemento. O LPG tem como principais funções a capacidade de inibir a fusão fagolisossomal durante o processo de invasão celular no hospedeiro vertebrado, bem como desempenhar papel importante na adesão do parasito à superfície das células epiteliais do intestino do hospedeiro invertebrado (GUEIRARD et al., 2008; BARRETO-BERGTER; VERMELHO, 2010).

Esta molécula também está relacionada com o processo de evasão, utilizando resíduos de manose do LPG que se ligam em receptores de manose-fucose da célula hospedeira para facilitar a fagocitose do parasito. O LPG também interage com a proteína C reativa (PCR) desencadeando a fagocitose através do receptor de PCR (OLIVIER et al., 2005).

Outra estratégia de sobrevivência utilizada por parasitos *Leishmania* é a inibição de enzimas hidrolíticas e outras moléculas destrutivas que são secretadas no fagolisossomo. As peroxidoxinas e superóxido dismutase degradam derivados de nitrito e radicais intermediários reativos de oxigênio, que são as moléculas microbicidas mais importantes (HOLZEMULLER et al., 2005).

Estudos recentes têm demonstrado a capacidade de algumas espécies de *Leishmania* de resistir a ação do *burst* oxidativo do macrófago, aparentemente silenciando mecanismos de síntese de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (HOLZEMULLER et al., 2005; SOUZA et al., 2010).

1.4 LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma zoonose de animais silvestres, sendo o homem um hospedeiro acidental que se infecta quando fêmeas de insetos flebotomíneos realizam repasto sanguíneo. O vetor transmite formas promastigotas ao hospedeiro vertebrado, o qual poderá desenvolver uma variedade de formas clínicas, que dependerá da espécie e da cepa do parasito, bem como da capacidade de resposta do organismo à infecção.

As principais formas clínicas das leishmanioses são as leishmanioses cutâneas, leishmaniose mucocutânea e a leishmaniose visceral. A variedade de leishmanioses cutâneas e mucocutânea no novo mundo compõem o que conhecemos como leishmaniose tegumentar americana (LTA).

A LTA é uma doença infecciosa, crônica e não contagiosa. Apresenta-se com um espectro de manifestações clínicas, incluindo a leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutânea disseminada Borderline (LCDB) e a leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD). As principais espécies que causam a LTA no Novo mundo são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) mexicana* (Fig. 4) (HERWALDT, 1999; SILVEIRA et al., 2009).

As manifestações clínicas típicas da LCL são as de uma lesão ulcerada com bordas elevadas, frequentemente localizada nos membros inferiores (CASTES et al., 1993). A LMC é uma doença degenerativa que afeta predominantemente a nasofaringe, é mais comum nas áreas de transmissão por *Leishmania (V.) braziliensis* e geralmente ocorre meses ou anos após a infecção por LCL (CARVALHO et al., 1994). A LCDB é caracterizada por lesões múltiplas e pleomórficas, acneiformes, papulosas ou lesões nodulares cutâneas em duas ou mais áreas não contíguas do corpo (COSTA et al., 1986). A LCAD consiste em uma forma rara de LTA que pode ser causada pelas espécies *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) mexicana*. (SILVEIRA, 2009).

As leishmanioses são consideradas como uma das seis doenças infecto-parasitárias de maior importância no mundo de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Estão presentes em 98 países, em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com uma incidência anual de 1 a 2 milhões de casos e representa um risco para cerca de 350 milhões de pessoas que vivem em áreas de transmissão. Na América

Latina a LTA representa um grave problema de saúde pública, sobretudo no Brasil. Há registros de sua ocorrência na maioria dos estados brasileiros (Fig. 3-A) (WHO, 2014). Em 2012 foram notificados 23.004 casos no país, de acordo com o Ministério da Saúde. A região Norte tem apresentado um aumento na incidência dos casos devido ao intenso processo de exploração e ocupação da Amazônia, na qual foram notificados aproximadamente 43% dos casos de LTA do Brasil em 2012, predominando nos estados do Pará, Amazonas, Rondônia e Acre. O Estado do Pará é o que mais registra casos de LTA na região Norte, com 3.921, no Brasil, só é superado pelo estado da Bahia, o qual registrou 4.249 casos em 2012. No estado do Pará a LTA apresenta elevada endemicidade, com uma taxa de incidência anual superior à média nacional (Fig. 3-B) (BRASIL, 2013).

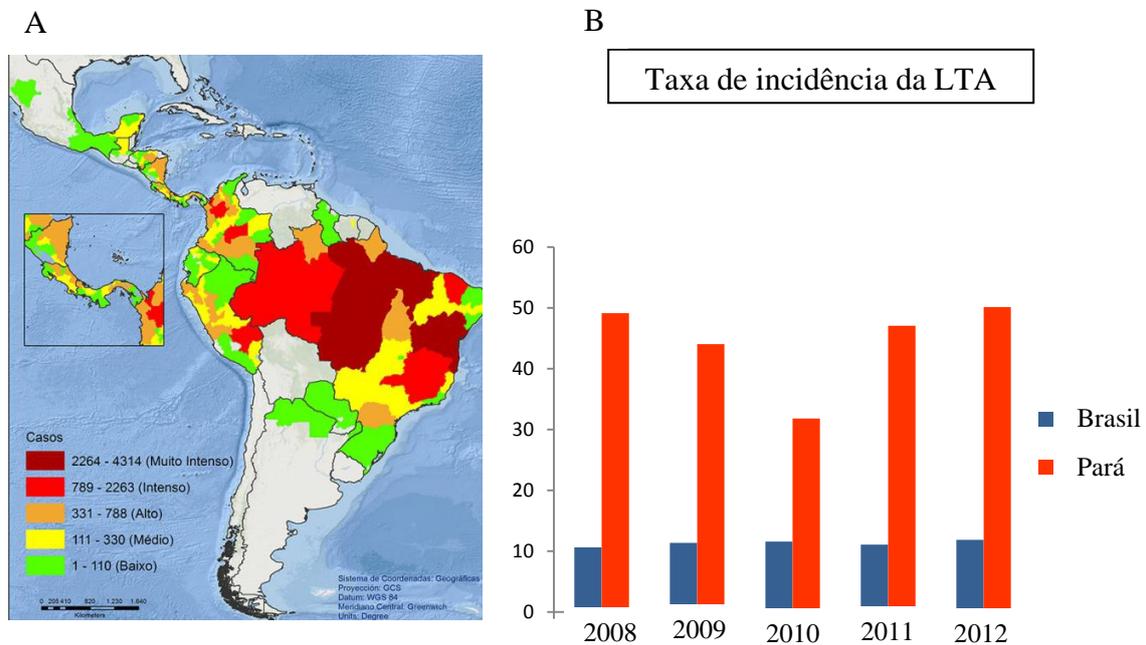


Figura 3. Mapa mostrando a incidência da LTA na América latina no ano de 2012 (A) (WHO, 2014). Gráfico comparando as taxas de incidência da LTA no Estado do Pará com a média nacional no período de 2008 a 2012 (B) (BRASIL, 2013).

1.4.1 Leishmanioses causadas por *Leishmania*. (*L.*) *amazonensis*

A espécie *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* ocorre em vários países da América do Sul, América Central e América do Norte, sobretudo na região Amazônica. Geralmente a doença é de baixa endemicidade com casos dispersos (WHO, 2010).

A LCL pode ser causada por várias espécies de ambos os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. As lesões podem ocorrer em qualquer parte do corpo, mas geralmente se originam no local da inoculação dos parasitos pelo vetor. Neste local surge uma mácula, seguida por uma pápula que ulcera e se expande, formando uma lesão arredondada em formato de cratera ou evolui como uma lesão nodular. As lesões podem se desenvolver semanas, meses ou mesmo anos após a infecção. Na LCL causada por *Leishmania (L.) amazonensis* predomina a resposta imune celular mediada por linfócitos TCD4+, com perfil de citocinas do tipo Th1, atuam o interferon gama (INF- γ) e a interleucina 12 (IL-12) como citocinas pró-inflamatórias e a IL-4 e IL-10 como citocinas moduladoras da resposta inflamatória (SILVEIRA et al., 2004).

A LCDB apresenta-se com inúmeras lesões nodulares ou ulceradas em extensas áreas do corpo, podendo ter de vinte a mais de cem lesões cutâneas sem que haja o envolvimento das mucosas. Na LCDB causada pela espécie *Leishmania (L.) amazonensis* há um equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 (SILVEIRA et al., 2009)

A LCAD é ocasionada por uma imunossupressão celular específica induzida pela espécie *Leishmania (L.) amazonensis*, produzindo lesões fechadas, tais como pápulas, nódulos e tubérculos que raramente sofrem ulcerações. Na LCAD o perfil de expressão de citocinas é predominantemente do tipo Th2, com elevada concentração de anticorpos e baixas concentrações de INF- γ e IL-12 (SILVEIRA, 2009).

A espécie *Leishmania (L.) amazonensis* é conhecida por inibir a resposta imunológica da célula hospedeira subvertendo a maquinaria celular e modulando o ambiente em seu favor. O parasito interfere nas vias de sinalização intracelular da célula hospedeira para evitar uma resposta imune efetiva (OLIVIER et al., 2005; MUKBEL et al., 2007).

1.4.2 Leishmaniose causada por *Leishmania (V.) braziliensis*

A ocorrência da infecção pelo protozoário *Leishmania (V.) braziliensis* compreende quase todos os países da América do Sul e América Central, sobretudo em regiões tropicais. A infecção está relacionada com atividades na selva, e particularmente, com a destruição da floresta, a transmissão ocorre durante todo o ano, mas com flutuações sazonais. O risco de infecção é maior em grupos populacionais que penetram a floresta, podendo ocorrer focos silvestres e peridomésticos (WHO, 2010).

A proporção de indivíduos infectados que evoluem para a forma mucocutânea é de 5%, apresentando a forma cutânea primária e somente após algumas semanas ou até

mesmo anos que surgem as manifestações mucocutâneas da doença. É causada principalmente pelas espécies *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) panamensis*, tendo a grande maioria de sua ocorrência na Bolívia, Brasil e Peru. A característica peculiar destas espécies é que elas causam metástases para outros tecidos da mucosa da boca e trato respiratório superior por disseminação linfática ou hematogênica. Condições semelhantes causadas por outras espécies de *Leishmania* têm sido relatadas em pacientes imunossuprimidos (FERREIRA; BORGES, 2002).

Na LCL causada por *Leishmania (V.) braziliensis* predomina uma resposta imune mediada por linfócitos TCD4+, com perfil de ativação por citocinas do tipo Th1. No entanto, a expressão do INF- γ por macrófagos infectados é muito elevada, ao passo que as citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 encontram-se em baixas concentrações, contribuindo para uma resposta imune celular exacerbada. Já na LMC ocorre uma resposta imune celular ainda mais severa, ocasionando necrose tecidual das mucosas devido à intensa reação de hipersensibilidade (COUTINHO et al., 1996; SILVEIRA et al., 2004).

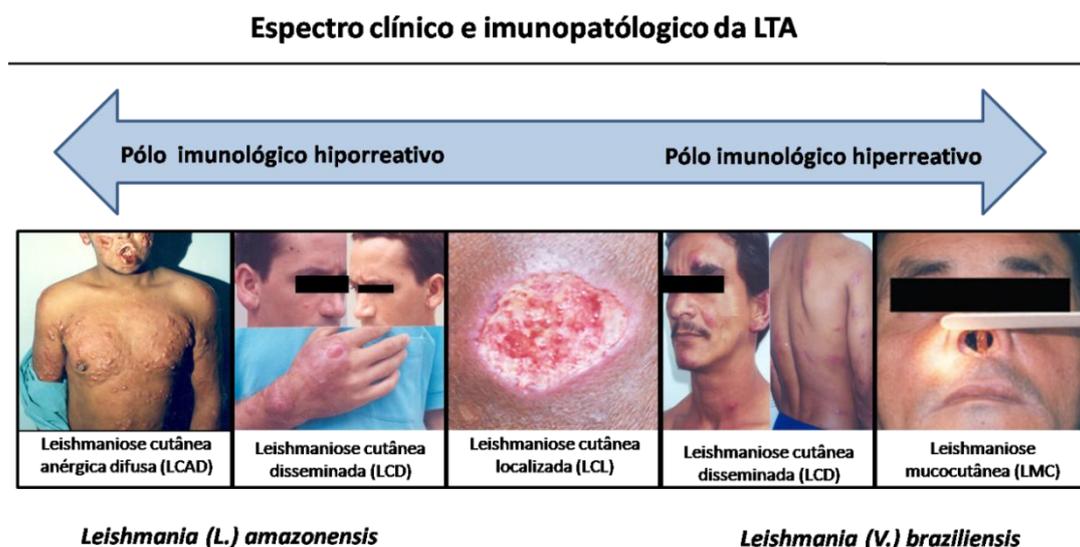


Figura 4. Representação esquemática do espectro clínico e imunológico da LTA evidenciando os pólos de hipersensibilidade nas infecções pelas espécies *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis* (SILVEIRA et al., 2009 – com modificações).

1.5 RESPOSTA MICROBICIDA

Após realizar a fagocitose dos parasitos na camada basal da derme, os macrófagos permanecem com um grande número de parasitos vacuolizados. O infiltrado de linfócitos e células plasmáticas aumenta progressivamente a medida que a lesão evolui. A eliminação dos parasitos é seguida pela destruição dos macrófagos infectados, com a liberação de amastigotas na derme ou zona subepidérmica, fazendo com que ocorra a liquefação e ulceração da camada basal. Conforme a lesão se expande, aumenta a área de necrose, com aumento de células polimorfonucleares na zona central, e numerosos linfócitos na periferia (WHO, 2010).

Durante o período de destruição ativa dos parasitos, são visualizadas alterações teciduais agudas, como edema superficial na derme, danos ao colágeno e elastina com aumento de reticulina seguido por fibrose. O perfil das citocinas Th1 e Th2 é muito variável e depende da maneira como o protozoário parasita interage com a célula hospedeira.

Nas leishmanioses a resposta imune é predominantemente mediada por células, as quais podem atuar com a função protetora ou ativando intensa resposta inflamatória. Os linfócitos T com fenótipo CD4+ tipo Th1 produzem INF- γ , fator de necrose tumoral (TNF- α) e diversas citocinas que estimulam a ativação de macrófagos e a destruição dos parasitos. Enquanto que os linfócitos CD4+ do tipo Th2 produzem citocinas que inibem a ativação de macrófagos e levam a ativação de linfócitos B que produzem anticorpos, principalmente das classes IgG e IgE (WHO, 2010). Acredita-se que as citocinas do tipo Th1 sejam determinantes para a resistência ao parasito, enquanto que as citocinas Th2 estejam relacionadas à suscetibilidade a doença (SILVEIRA et al., 2004).

Dentre os mecanismos microbicidas, destacam-se a ativação de enzimas líticas, produção de citocinas e ativação do *burst* oxidativo, que tem a finalidade de potencializar a atividade de enzimas como a NADPH-oxidase, mieloperoxidase e óxido nítrico sintase (ASSCHE et al., 2011).

Os mecanismos de ação do NO em *Leishmania* não são bem esclarecidos, no entanto, acredita-se que esta molécula atue em conjunto com espécies reativas de oxigênio (ROS) causando danos ao DNA, proteínas e lipídios do parasito. O NO pode ligar-se covalentemente ao ferro intracelular e com grupamentos protéicos que contenham ferro (por exemplo, complexo I e II da cadeia de transporte de elétrons

mitocondriais) e inativar e degradar estas enzimas, cessando a replicação do parasito (GENESTRA et al., 2003).

Em infecções cutâneas causadas por algumas espécies de *Leishmania*, como por exemplo, *Leishmania (L.) major*, geralmente ocorre cura espontânea das lesões. Esta cura é atribuída a atuação das células T CD4+ tipo Th1, da IL-12, do INF- γ e da atividade da iNOS (óxido nítrico sintase induzida). Macrófagos ativados sintetizam IL-12, que induzem linfócitos T CD4+ a produzir INF- γ e estimulam os macrófagos a liberar TNF- α , estas citocinas atuam em sinergia para induzir a ativação da NOS (BOGDAN et al., 2000 B).

Macrófagos ativados por linfócitos T CD4+ tipo Th2 expressam uma gama de citocinas anti-inflamatórias (TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-13), tornando-se permissivos para o desenvolvimento do parasito. No entanto, a IL-10 também atua para evitar uma resposta pró-inflamatória excessiva, impedindo a síntese de citocinas por células Th1, especialmente o INF- α . (BALAÑA-FOUCE et al., 2011).

Em modelos murinos infectados com *Leishmania (L.) major*, existe uma clara dicotomia entre a resposta Th1 e Th2. Quando a leishmaniose cutânea (similar ao modelo humano) induz resposta do tipo Th1, associada a um alto nível de INF- γ e baixos níveis de IL-4, ocorre cura espontânea seguida de proteção contra o parasito. No entanto, quando a infecção induz resposta do tipo Th2, associada a baixos níveis de INF- γ e elevados níveis de IL-4, a doença evolui para a letalidade. Este padrão de resposta ainda não é bem definido na leishmaniose humana (ROSTAMI et al., 2010).

Apesar dos potentes mecanismos leishmanicidas do macrófago, o parasito pode infectar e se multiplicar nestas células. Um importante fator para a infecção é que as células parasitadas parecem ser menos sensíveis a ativação por citocinas, como o TNF- α . Além disso, macrófagos infectados *in vitro* por *Leishmania (L.) amazonensis* ou *Leishmania (V.) braziliensis* produzem TGF- β , um inibidor da síntese de NO. A capacidade de inibir a atividade da iNOS constitui um importante mecanismo de evasão do parasito (BALESTIERI et al., 2002).

1.6 ÓXIDO NÍTRICO E ÓXIDO NÍTRICO SINTASE

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa pequena e simples, que tem potencial tóxico devido a presença de radical livre. Está presente no ar atmosférico em pequenas quantidades e quando diluído, o NO tem uma meia vida média de 10 segundos, devido à sua rápida oxidação a nitratos (NO_3^-) e nitritos (NO_2^-). Portanto, as dosagens de nitratos e nitritos indicam a produção indireta de NO, sendo estas moléculas denominadas reativos intermediários de nitrogênio. O NO também tem afinidade pela hemoglobina e outras hemoproteínas interrompendo sua funcionalidade (LOWENSTEIN; SNYDER, 1992).

O NO pode atuar em vários sistemas fisiológicos, tais como na contração muscular, agregação plaquetária e como neurotransmissor, podendo também ter ações endócrinas, autócrinas e parácrinas. A sua ação na imunoregulação se faz presente nos processos inflamatórios e nos mecanismos de autoimunidade (FLORA FILHO et al., 2000).

Na figura 4, observa-se a reação química clássica de formação do NO a partir do aminoácido L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). A oxidação da L-arginina pela NOS ocorre na presença da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio (NADPH), cálcio iônico (Ca^{+2}) e oxigênio molecular (O_2) (DAFF, 2010).

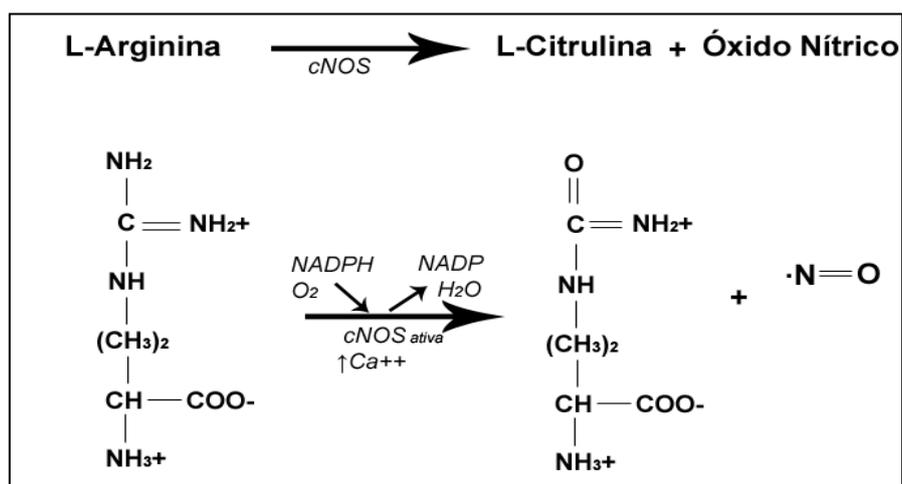


Figura 5. Desenho esquemático da reação química de oxidação da L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase produzindo a L-citrulina e uma molécula de óxido nítrico (DAFF, 2010 – Com adaptações).

A L-arginina é um aminoácido essencial para os mamíferos, produzida pelo organismo, mas em quantidades insuficientes. A L-arginina é utilizada no ciclo da uréia, na síntese de creatinina e fornece ornitina para a síntese de poliaminas. Como a necessidade de L-arginina é constante, sua neo síntese ocorre nos túbulos proximais renais a partir da citrulina (KONTUREK; KONTUREK, 1995).

As enzimas óxido nítrico sintases (NOS) são hemoproteínas da família citocromo p450-like, que possuem três isoformas descritas, sendo duas formas constitutivas (cNOS) e uma forma induzível (iNOS). Estas isoformas são estruturalmente semelhantes, no entanto são reguladas por mecanismos diferenciados (FLORA FILHO et al., 2000).

O óxido nítrico é um importante componente ativo envolvido na morte de *Leishmania* em macrófagos ativados por citocinas. No entanto, a atuação leishmanicida da enzima NOS da célula hospedeira também depende da participação das espécies reativas de oxigênio (ROS). Juntos, ROS e NO constituem uma importante ferramenta leishmanicida (DEGROSSOLI et al., 2011).

Macrófagos totalmente ativados podem utilizar a L-arginina como substrato para a síntese de NO pela ativação da enzima NOS, no entanto quando os macrófagos estão parcialmente ativados, a L-arginina é preferencialmente utilizada para a síntese de poliaminas pela ativação da enzima arginase, podendo aumentar a persistência e replicação do parasito. Quando macrófagos são estimulados por citocinas Th1 (INF- γ , TNF- α), ligantes de receptores toll-like e LPS, ocorre o catabolismo da L-arginina pela iNOS para a produção de NO, ao passo que as citocinas Th2 (IL-4, IL-10, IL-13 e o TGF- β) induzem a expressão de arginase, convertendo L-arginina em poliaminas (WANASEN; SOONG, 2009).

As NOS de mamíferos possuem dois domínios de atividade, o domínio oxigenase e o domínio redutase. No domínio redutase liga-se o NADPH que transfere elétrons para que possa se formar o sítio de ligação da calmodulina e ativar o domínio oxigenase, o qual sintetiza o NO (DAFF, 2010).

Em organismos mamíferos a produção de NO é feita por três isoformas distintas da enzima NOS: a nNOS (ou tipo 1), a iNOS (ou tipo 2) e a eNOS (ou tipo 3). São produtos de genes diferentes, com localização, regulação e propriedades catalíticas distintas. As isoformas constitutivas (nNOS e eNOS) são dependentes de cálcio, enquanto que a iNOS independe. No entanto isto é válido para mamíferos, não sendo

regra para outras espécies, as quais o mecanismo de regulação da enzima NOS ainda não está devidamente esclarecido (ALDERTON et al., 2001).

A nNOS é predominantemente expressa de uma forma constitutiva no sistema nervoso central e sistema nervoso periférico, onde está envolvida em processos fisiológicos e patológicos da neurotransmissão. A mtNOS (ou bNOS α) é encontrada em células hepáticas, cérebro, coração, músculos, rins, pulmão, testículo e baço. A mtNOS não é considerada uma nova isoforma da enzima NOS, mas sim uma variante de nNOS, porém com modificações pós-traducionais. A produção de NO pela mitocôndria modula o consumo de O₂ da organela pela inibição competitiva da citocromo-oxidase, e como consequência modula a produção de radicais livres de oxigênio (ELFERING et al., 2002).

A nNOS é uma enzima inteiramente citosólica, ao contrário de eNOS que é primariamente ancorada a membrana (ZHOU; ZHU, 2009). Outra isoforma, a eNOS (ou tipo 3), foi originalmente descoberta no sistema cardiovascular e sua produção e liberação é realizada por células endoteliais com a finalidade de promover ação homeostática, como regular a pressão arterial e inibir a agregação plaquetária. Posteriormente, alguns estudos têm evidenciado o papel da eNOS durante a resposta imune, mostrando que o NO derivado de eNOS é capaz de impedir a adesão e transmigração vascular de leucócitos. E também foi demonstrado que citocinas e produtos microbianos são capazes de regular a expressão de eNOS em células endoteliais, epiteliais e astrócitos (FRITZSCHE et al., 2010).

A iNOS desempenha um papel relevante no sistema imunológico, onde exerce função antiviral, antimicrobiana, tumoricida e imunoregulação. É regulada por citocinas e produtos microbianos, os quais aceleram sua transcrição e sua atividade catalítica, bem como alteram sua localização intracelular. É expressa principalmente por fagócitos profissionais, como o macrófago (BOGDAN et al., 2000 B). A iNOS se liga à calmodulina mesmo em baixas concentrações de cálcio, não se dissociando facilmente, logo sua atividade é mais duradoura comparada à atividade das isoformas constitutivas (DAFF, 2010).

A presença das enzimas NOS em protozoários parasitas foi inicialmente descrita em *Trypanosoma cruzi* por Paveto e colaboradores (1995). Em seguida foi demonstrado que o aumento da motilidade em epimastigotas estava relacionada à produção de NO (PEREIRA et al., 1997). Posteriormente, foi comprovado que a enzima NOS em *T. cruzi* também utiliza o substrato L-arginina (PIACENZA et al., 2001). Genestra e

colaboradores (2003) identificaram que *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) infantum chagasi* são capazes de produzir NO em cultivo. Posteriormente (2006), este mesmo grupo relatou a presença de uma isoforma constitutiva da enzima NOS nestes parasitos.

1.7 A ENZIMA ARGINASE E OS GLICOSSOMOS

A L-arginina é o aminoácido precursor para a biossíntese de poliaminas na maioria dos organismos vivos, incluído o parasito *Leishmania*. Para isto é necessário que este aminoácido seja hidrolisado pela enzima arginase. As poliaminas atuam de duas formas em tripanossomatídeos, estão envolvidas na proliferação inicial do parasito dentro da célula hospedeira e atua ligada à glutatona na limpeza de radicais livres de enxofre (BALAÑA-FOUCE et al., 2011)

A arginase é uma metaloproteína dependente do íon manganês (Mn^{2+}) que utiliza o aminoácido L-arginina como substrato para produzir L-ornitina e uréia no ciclo da uréia em células mamíferas. Em protozoários *Leishmania*, a arginase contribui para a síntese de L-ornitina, que é um dos precursores da síntese de poliaminas.

A arginase em *Leishmania (L.) amazonensis* possui uma sequencia C-terminal de aminoácidos (SKL) que garante seu endereçamento ao glicossomo. A compartimentalização desta enzima é importante para seu crescimento e infectividade (DA SILVA et al., 2012).

A L-arginina se liga preferencialmente com a enzima arginase no glicossomo, devido sua elevada afinidade, no entanto caso a reação da L-arginina aconteça com a enzima NOS, ocorre a produção do intermediário OH-ARG que atua como um inibidor da arginase, portanto a ativação da enzima NOS implica na inibição da enzima arginase (KROPF et al., 2005).

Os glicossomos são organelas citoplasmáticas presentes nos tripanossomatídeos formados por uma bicamada fosfolipídica e não possuem conteúdo genético. Tem a função de armazenamento de algumas enzimas da via glicolítica, armazenamento e oxidação de aminoácidos, beta-oxidação de ácidos graxos e acúmulo de compostos tóxicos (PARSONS, 2004).

As principais vias metabólicas e enzimas estudadas como alvos para o desenvolvimento de novos fármacos contra tripanossomatídeos são: enzimas envolvidas

na via glicolítica, síntese de poliaminas, síntese de arginase, síntese de óxido nítrico, biossíntese de esteróis, síntese de folato, síntese de microtúbulos, DNA topoisomerase, cisteína proteinase, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase e superóxido dismutase (MELOS; ECHEVARRIA, 2012).

Uma importante enzima da via glicolítica armazenada em glicossomos é a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que exerce papel significativo no controle do fluxo glicolítico. A GAPDH funciona também como um importante marcador glicossomal.

Por serem organelas exclusivas de tripanossomatídeos, os glicossomos são promissores alvos para o desenvolvimento de quimioterápicos alternativos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar comparativamente a presença da forma constitutiva da enzima Óxido Nítrico Sintase (cNOS) e a produção de óxido nítrico em protozoários das espécies *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a produção de NO em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis*.
- Colocalizar a enzima cNOS com GAPDH em glicossomos presentes em *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis*.
- Localizar ultraestruturalmente a enzima cNOS em *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DE PROMASTIGOTAS

Promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) e *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1999/M17593) foram obtidas em meio NNN através do Programa de Leishmaniose do Instituto Evandro Chagas. Os parasitos foram cultivados em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 10% de GPPS (Glutamina 0,2 M; ácido pirúvico 0,0125M; penicilina/estreptomicina 1%) e mantidos em 27 °C em estufa B.O.D. O repique foi realizado durante a fase logarítmica de crescimento de cada espécie. Para as análises, foram utilizadas promastigotas em fase estacionária.

3.2 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

O 4-Amino-5-Metilamino-2',7'-Difluorofluoresceína (DAF-FM) é um marcador fluorescente que se liga irreversivelmente ao óxido nítrico, o produto da reação é um composto benziotriazol que, excitado em um comprimento de onda de 495 nm, emite fluorescência com pico de 515 nm (fluorescência verde).

Para análise as células foram centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos e ressuspendidas em solução de PBS pH 7,2. Em seguida, essas células foram centrifugadas novamente a 1.500 rpm por 10 minutos e incubadas por 30 minutos com 10 mM de DAF-FM. Posteriormente as células foram centrifugadas novamente e ressuspendidas em PBS, foram levadas ao citometro de fluxo (BD FACSCantoII™) submetidas a um comprimento de onda de excitação de 488 nm. Os dados foram obtidos utilizando o software BD FACSDiva®. Um total de 10.000 eventos foram coletados para cada amostra e analisados com auxílio do programa WinMDI 2.9. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagens.

Foi feita marcação com Iodeto de propídio (IP) por 5 minutos para que fosse obtido o percentual de células mortas.

As células foram também aderidas em lamínulas cobertas com 0.1% de poli-L-lysina, e analisadas em Microscópio Laser Confocal LSM 5 Pascal Zeiss.

3.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis* foram fixadas com 4% de paraformaldeído em tampão PHEM 0,1 M, pH 7.2 por um período de 30 minutos e posteriormente aderidas em lamínulas cobertas com 0,1% de poli-L-lysina, as células foram permeabilizadas com 0,1% de Triton-X 100 durante 30 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas com tampão PBS com 1% de Soro Albumina Bovina (PBS-BSA 1%) por 10 minutos e incubadas por 1 hora com 50mM de NH₄Cl, em seguida foi feita lavagem em PBS-BSA 1%. Foi realizada dupla marcação para colocação da enzima cNOS com organelas glicossomais. Para isto, foram utilizados anticorpos policlonais anti-cNOS produzido em *rabbit* e anti-GAPDH produzido em *goat* (C-terminal) para marcação glicossomal (ambos Sigma), cada um foi incubado por 1 hora em temperatura ambiente com diluição 1:100 em PBS-BSA 1% e posteriormente a segunda incubação com os anticorpos secundários Alexa-Fluor 594 nm anti-rabbit (Molecular Probes®) para enzima cNOS e Alexa-Fluor 488 nm anti-goat (Molecular Probes®) diluído 1:100 no mesmo tampão. As lamínulas foram montadas em lâminas contendo *ProLong Gold antifade reagent* (Molecular Probes®), e analisadas em Microscópio Laser Confocal LSM 5 Pascal Zeiss. Como controle negativo foi feita a omissão dos anticorpos primários.

3.4 IMUNOLOCALIZAÇÃO DA ENZIMA cNOS

Para imunolocalização da enzima cNOS por MET, foi utilizado amostras incluídas em resina hidrofílica Unycril®. As células foram fixadas com solução de fixação (glutaraldeído 0,1%, paraformaldeído 4%, sacarose 2,5% e ácido pícrico 0,2% diluídos em tampão PHEM 0,1M) por 1 hora, em seguida lavadas com tampão PHEM 0,1M, incubadas com solução de 50 mM de NH₄Cl por 30 minutos, desidratadas com metanol 30%, 50%, 70% e 90% por 1 hora cada, infiltradas com resina Unycril® e incluídas em cápsulas próprias a -20°C sob incidência de luz ultravioleta por 3 dias. Posteriormente os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrótomo (Leica EM UC6) em grades de níquel.

Os cortes ultrafinos obtidos foram incubados com solução 50 mM de NH₄Cl por 30 minutos para bloquear sítios inespecíficos de ligação. Posteriormente incubados com

solução de PBS-BSA 1% e Tween20 a 0,01% durante uma hora. Em seguida as amostras foram incubadas com o anticorpo primário anti-cNOS produzido em *rabbit* diluído em PBS-BSA 1% e Tween20 a 0,01% durante uma hora. Foram feitas três lavagens com PBS-BSA 1% e Tween20 durante 5 minutos cada. Posteriormente incubadas com o anticorpo secundário IgG complexado com partículas de ouro coloidal de 10nm de diâmetro durante uma hora, em seguida lavagens com PBS-BSA3%, PBS-BSA 1% e PBS comum e duas lavagens com água destilada, todas as lavagens feitas durante 10 minutos cada. As amostras foram contrastadas com acetato de uranila 5% por 20 minutos e citrato de chumbo por 5 minutos. A análise feita em microscópio eletrônico de transmissão EM 906 LEO (UFPA) e EM 900 Zeiss (UFRJ).

4 RESULTADOS

4.1 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

A quantificação da produção de óxido nítrico é uma forma de se detectar a atividade da enzima cNOS *in vitro*. Utilizando o marcador DAF-FM para mensurar a produção de NO por citometria de fluxo em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis*, podemos observar que ambas as espécies apresentaram atividade da enzima cNOS. No entanto, *Leishmania (L.) amazonensis* apresentou reatividade da enzima cNOS significativamente maior quando comparado com *Leishmania (V.) braziliensis* (Fig.6 A).

Quando analisada a intensidade média de fluorescência (IMF), obtivemos o valor de 18,89 para *Leishmania (V.) braziliensis*, enquanto que para *Leishmania (L.) amazonensis* este valor foi de 92,17 (Fig.6B). Desta forma podemos concluir que a atividade da enzima cNOS é maior na espécie *Leishmania (L.) amazonensis* do que na espécie *Leishmania (V.) braziliensis*.

O padrão de marcação em promastigotas também foi visualizado por microscopia, evidenciando em verde a marcação de NO pelo DAF-FM e em vermelho a marcação de células mortas pelo iodeto de propídio (Fig. 7).

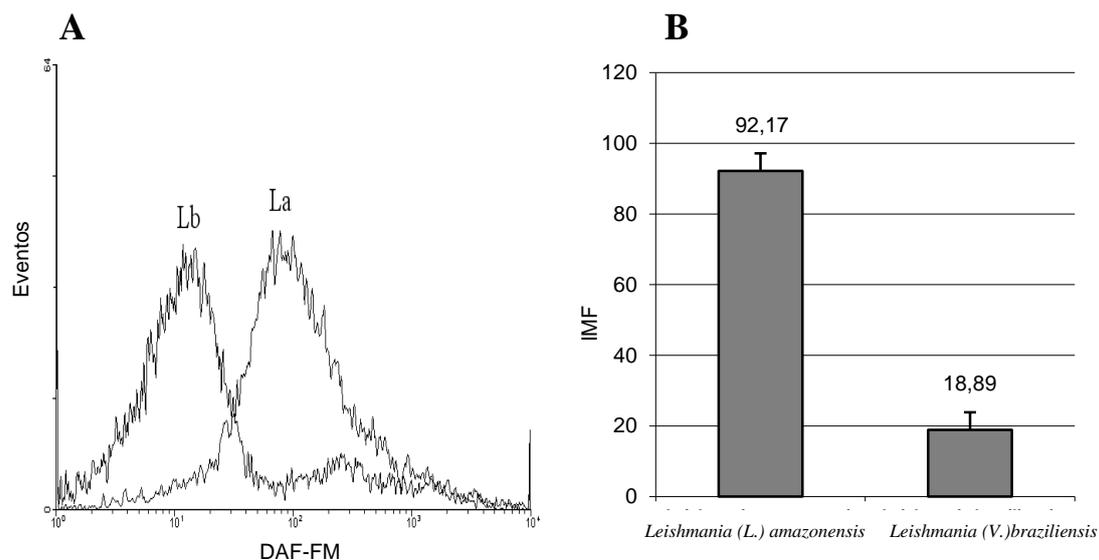


Figura 6. Citometria de fluxo para quantificação da produção de NO. Em A, podemos observar o histograma comparando a marcação com DAF-FM em *Leishmania (L.) amazonensis* (La) e *Leishmania (V.) braziliensis* (Lb) para um total de 10.000 eventos. Em B, o gráfico mostrando a intensidade média da fluorescência (IMF) do DAF-FM para cada espécie de *Leishmania*.

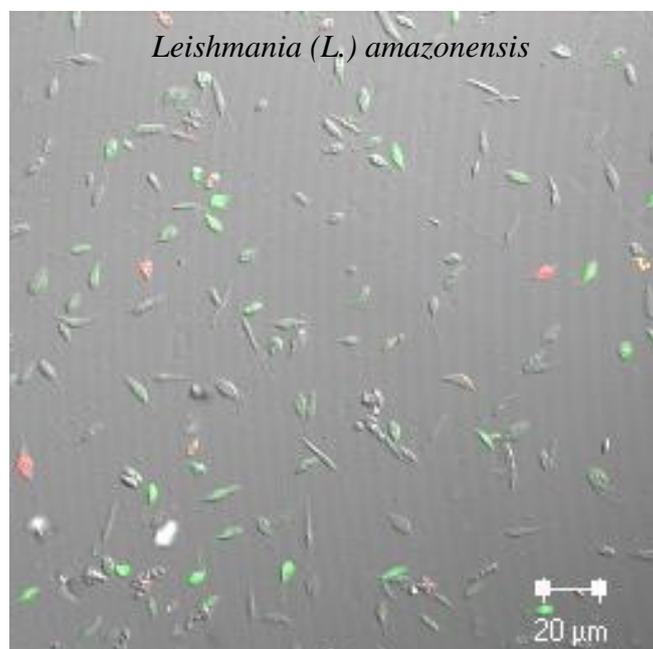


Figura 7. Microscopia de fluorescência evidenciando a produção de NO em *Leishmania (L.) amazonensis* pela marcação com DAF-FM (fluorescência verde) e a marcação de células mortas com Iodeto de propídio (fluorescência vermelha).

4. 2 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Nos ensaios de imunofluorescência indireta utilizando os anticorpos policlonais anti-cNOS e anti-GAPDH (para marcação de glicossomos), foi possível observar que as formas promastigotas das espécies *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis* expressaram a enzima cNOS em corpos esféricos no citoplasma. A marcação com o anticorpo anti-GAPDH permitiu comprovar a co-localização da enzima cNOS em compartimentos glicossomais tanto em *Leishmania (L.) amazonensis* (Fig. 8) quanto em *Leishmania (V.) braziliensis* (Fig. 9).

Leishmania (L.) amazonensis

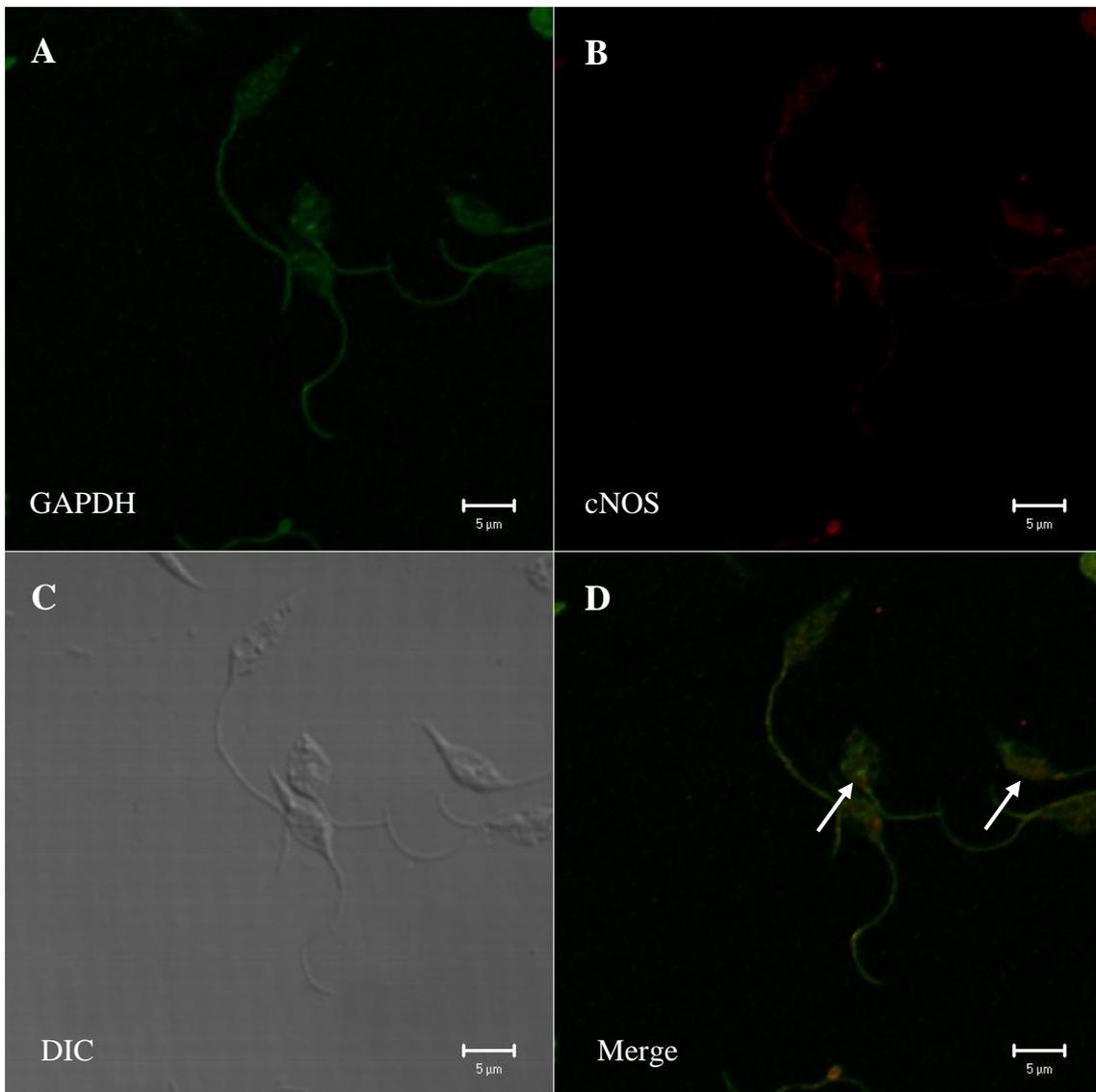


Figura 8. Ensaio de imunofluorescência indireta para detecção da enzima cNOS e marcação de glicossomos em *Leishmania (L.) amazonensis*. Nos quadrantes superiores observamos a marcação individual de cada anticorpo. No último quadrante (merge) podemos observar a sobreposição das imagens evidenciando a co-localização da enzima cNOS em organelas glicossomais.

Leishmania (V.) braziliensis

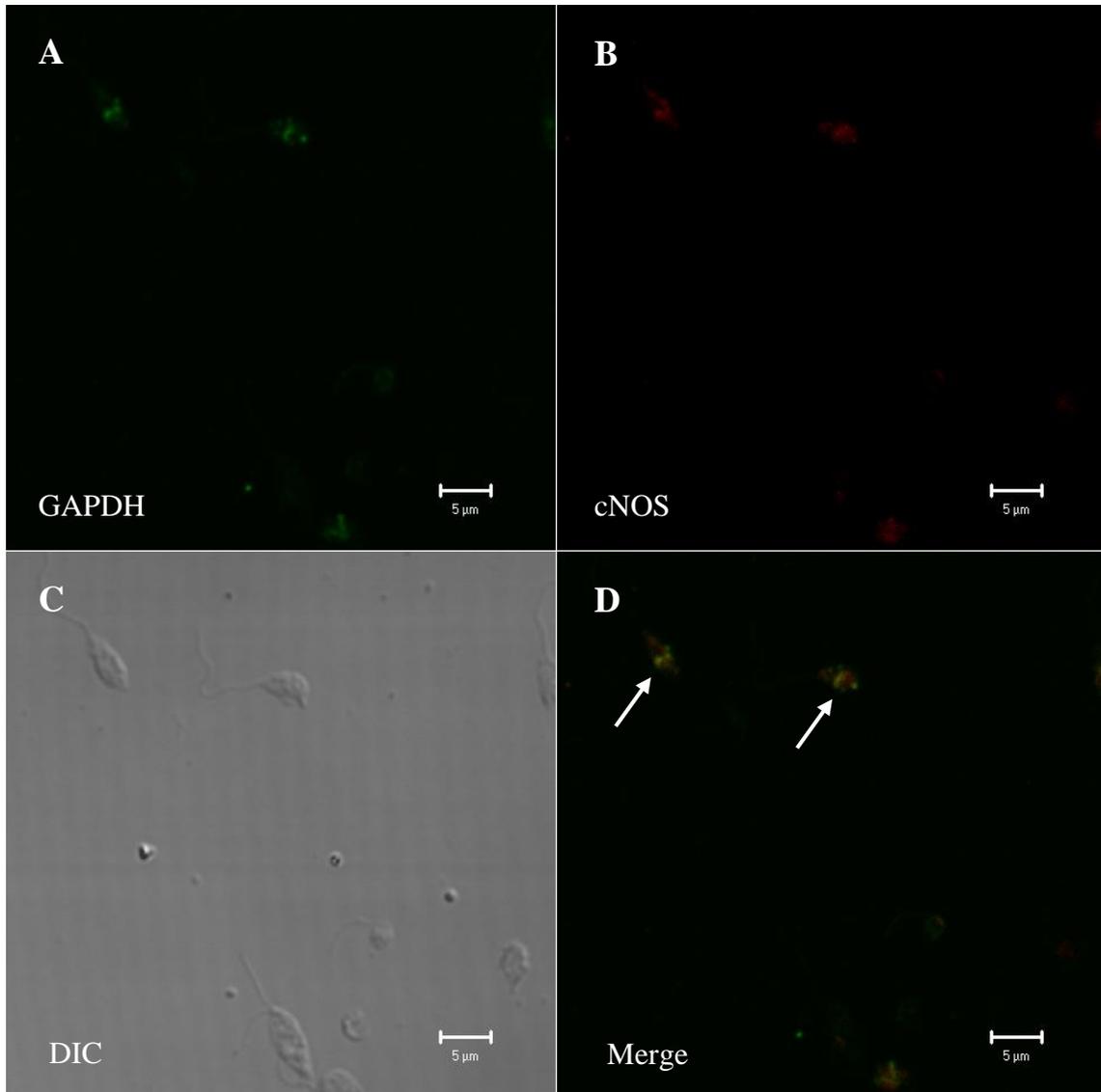


Figura 9. Imunofluorescência indireta para detecção da enzima cNOS em glicossomos de *Leishmania (V.) braziliensis*. Nos quadrantes superiores observamos a marcação do anti-GAPDH (A) e anti-cNOS (B). No último quadrante (merge) sobreposição das imagens evidenciando a co-localização da enzima cNOS em organelas glicossomais (setas).

4.3 IMUNOLOCALIZAÇÃO DA ENZIMA cNOS

Para localizar a enzima cNOS por MET, foi utilizada marcação desta enzima com anticorpo primário anti-cNOS e o anticorpo secundário complexado à partículas de ouro coloidal. Para realização deste experimento, foi feito processamento para microscopia eletrônica de transmissão utilizando resina hidrofílica Unycril e posteriormente a imunomarcação em corte.

Desta forma, foi possível detectar a presença da enzima cNOS em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (Fig. 10) e em *Leishmania (V.) braziliensis* (Fig. 11). Em ambas as espécies podemos observar que a distribuição intracelular da enzima cNOS se deu principalmente em regiões próximas a vesículas e na mitocôndria. Pequenos aglomerados de partículas de ouro coloidal que parecem estar se fusionando com vesículas sugestivas de glicosomos.

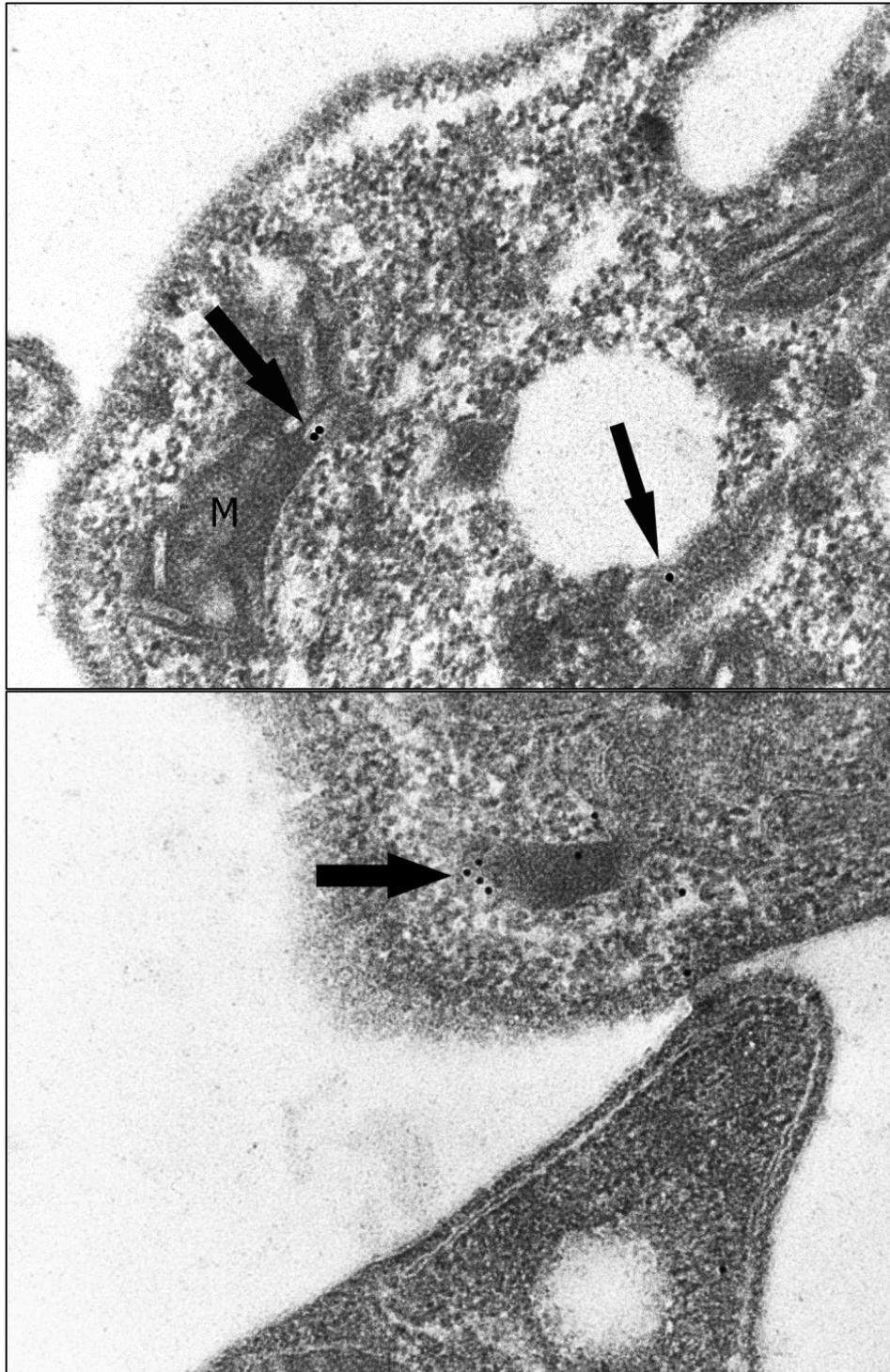


Figura 10. Localização ultraestrutural da enzima cNOS em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. As setas mostram a presença desta enzima próxima a uma estrutura vesicular e no interior da mitocôndria.

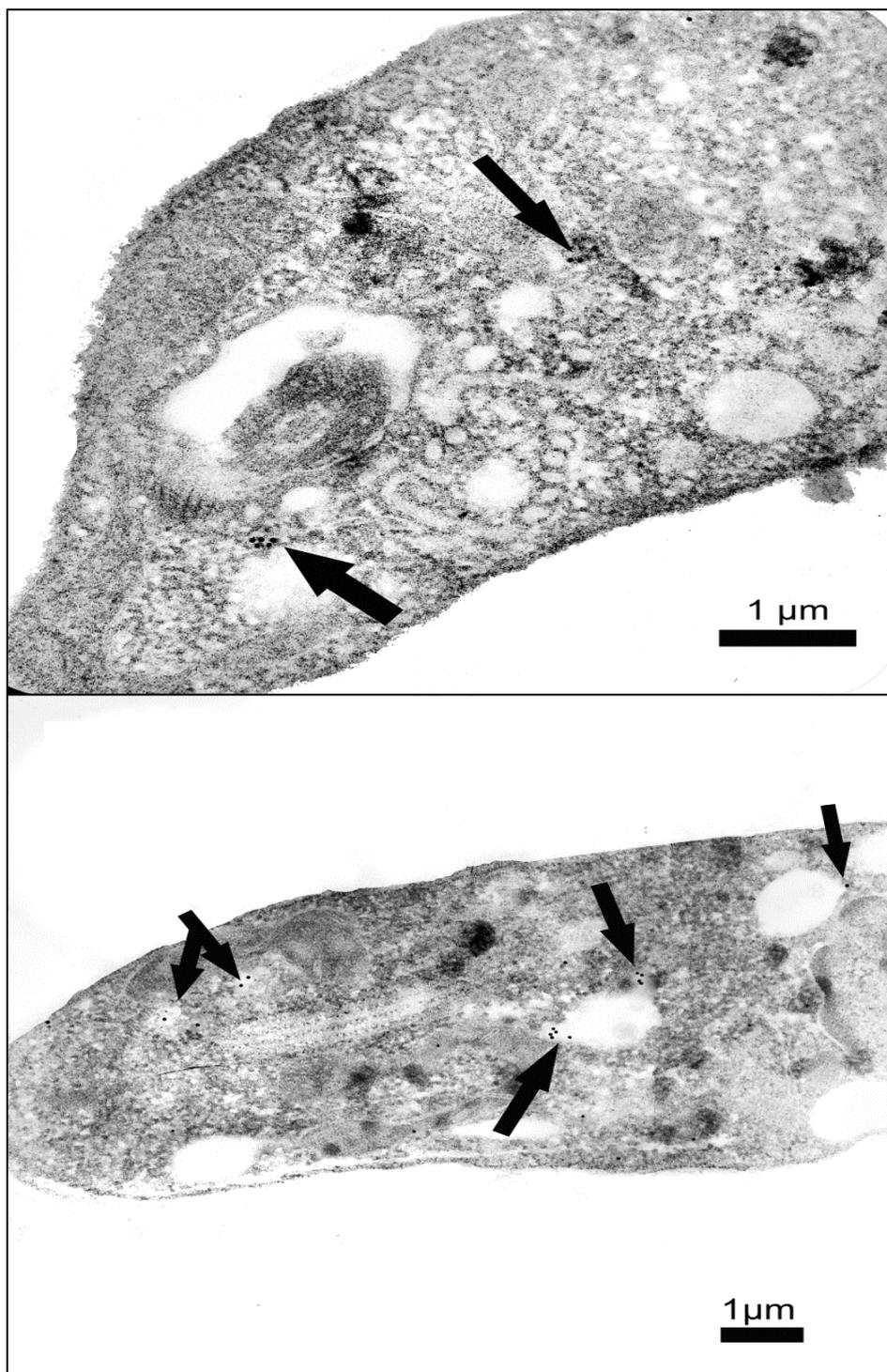


Figura 11. Localização ultraestrutural da enzima cNOS em *Leishmania (V.) braziliensis*. As setas mostram a presença das partículas de ouro coloidal próximas a estruturas vesiculares semelhantes a glicossomos e no interior da mitocôndria.

5 DISCUSSÃO

Para que os parasitos do gênero *Leishmania* possam se multiplicar no interior de macrófagos do hospedeiro de mamífero e estabelecer a infecção, é necessário que existam mecanismos capazes de burlar o sistema imune (BOGDAN et al., 2000 B). Seja inibindo a maquinaria celular (OLIVIER et al., 2005), ou pela síntese de moléculas como o NO, as quais podem modular a resposta do hospedeiro (GENESTRA et al., 2003).

Neste trabalho detectamos a produção de NO em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis* pela citometria de fluxo utilizando o DAF-FM. No entanto, detectamos atividade significativamente maior da enzima cNOS em *Leishmania (L.) amazonensis* (aproximadamente 5 vezes maior) quando comparada com a produção de NO em *Leishmania (V.) braziliensis*.

Resultados semelhantes também foram encontrados por Sarkar e colaboradores (2010) ao utilizar citometria de fluxo para avaliar a fluorescência do DAF2DA (marcador fluorescente para NO) em várias espécies de Leishmanias. Estes autores observaram uma produção de NO seis vezes maior em *Leishmania (L.) amazonensis* do que a produção de NO em *Leishmania (V.) braziliensis*.

Genestra e colaboradores (2003) utilizando o método de Griess para dosagem do nitrito (forma indireta de se detectar a produção de NO) mostraram que *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) i. chagasi* produzem NO nas primeiras 96 horas de cultivo *in vitro*. A produção de nitrito em *Leishmania (L.) amazonensis* não foi tão expressiva quanto na espécie *Leishmania (V.) braziliensis*, a qual apresentou produção de NO significativamente maior.

Basu e colaboradores (1997) foram um dos primeiros a isolar a enzima NOS em protozoários *Leishmania* utilizando a espécie *Leishmania (L.) donovani*. Devido semelhanças na cinética enzimática e a utilização de cofatores (NADPH e a dependência de cálcio para ativação), o trabalho sugere que a isoforma encontrada tem alta similaridade com a isoforma NOS tipo 1 encontrada em mamíferos.

Apesar das evidências que os protozoários *Leishmania* e *Trypanosoma* sintetizam NO em baixas concentrações a partir da L-arginina por uma NOS constitutiva, nenhum gene ortólogo semelhante a NOS constitutiva ou induzida de mamíferos foi encontrado na base de genes dos tripanossomatídeos. Entretanto, o gene que codifica a arginase já foi identificado no genoma de *Leishmania (L.) major*,

Leishmania (L.) i. chagasi, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi* (BALAÑA-FOUCE et al., 2011).

Genestra e colaboradores (2006) demonstraram que a espécie *Leishmania (L.) amazonensis* é capaz de produzir NO utilizando uma isoforma constitutiva da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que atua competindo pelo substrato L-arginina com a isoforma iNOS presente em macrófagos humanos.

Os tripanossomatídeos não possuem uma via biosintética do aminoácido L-arginina, por isso estes parasitas dependem do hospedeiro para sua captação. Este aminoácido é capturado do citosol da célula hospedeira e translocado para o interior do parasito por receptores transmembrana da família y+ (proteínas catiônicas responsáveis pela captação de aminoácidos), muito semelhante às proteínas da família CAT que fazem a captação de aminoácidos em células de mamíferos. (ROBERTS et al., 2004; BALAÑA-FOUCE et al., 2011). Portanto, a produção de NO *in vitro* por promastigotas de *Leishmania* provavelmente se deve ao consumo da L-arginina presente no meio de cultura.

Os aminoácidos e açúcares podem ser utilizados como fontes de energia para o parasito, tais compostos podem ser metabolizados em glicossomos e mitocôndrias. Glicossomos são estruturas delimitadas por membrana, onde há metabolização e degradação de açúcares. Pouco se sabe sobre a funcionalidade desta organela, mas estudos demonstraram que sua presença é abundante em amastigotas (OPPERDOES; COOMBS, 2007).

A L-arginina está envolvida em um processo crucial durante a infecção por *Leishmania*, pois pode atuar tanto como substrato para a síntese de NO e intensificar o potencial leishmanicida da célula hospedeira, quanto atuar como substrato para a enzima arginase sintetizando poliaminas (WANASEN; SOONG, 2009).

Em infecções onde prevalece a resposta tipo Th2, macrófagos induzem a arginase a sintetizar poliaminas e inibem a produção de NO a partir da L-arginina, promovendo assim a proliferação do parasita. Por outro lado o perfil de resposta Th1 está ligado a indução da iNOS e eliminação do parasita. Em mamíferos a indução de uma destas enzimas implica na supressão da outra devido a depleção do substrato (WANASEN; SOONG, 2009; BALAÑA-FOUCE et al., 2011).

Neste trabalho também foi possível detectar e localizar a enzima cNOS em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis*. Nos ensaios de imunofluorescência indireta foi observado que ambas as espécies são capazes

de expressar a enzima cNOS em regiões do corpo celular onde também foi possível detectar a presença da enzima GAPDH (marcador glicossomal).

Tendo a necessidade de visualizar a localização subcelular da enzima cNOS em promastigotas de *Leishmania*, foi realizada a imunolocalização por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Desta forma foi possível identificar a enzima cNOS presente em pequenas vesículas citoplasmáticas e também em mitocôndrias. Esta disposição mostra-se semelhante à localização da enzima arginase em glicossomos, a qual também utiliza o substrato L-arginina capturado por esta organela do parasita.

Da Silva e colaboradores (2008) utilizaram anticorpos fluorescentes específicos para glicossomos e arginase, comprovando a co-localização subcelular da enzima arginase em glicossomos de *Leishmania (L.) amazonensis*. Desta maneira, é possível que a cNOS também esteja presente nesta organela competindo com a enzima arginase pelo substrato L-arginina.

A compartimentalização das enzimas cNOS e arginase é essencial para os parasitos, pois a captação da L-arginina para o glicossomo cria um ambiente com elevada concentração do substrato, propiciando um ótimo funcionamento destas enzimas (BALAÑA-FOUCE et al., 2011).

Evidências recentes indicam que a enzima iNOS é recrutada para a membrana do recém formado vacúolo parasitóforo, em um processo crítico para a ação microbicida do NO. A espécie *Leishmania (L.) amazonensis* é capaz de aumentar o vacúolo parasitóforo, reduzindo a concentração de NO que entra em contato com o parasito. Por outro lado, *Leishmania (L.) major*, que habita em vacúolos parasitóforos menores parece ser mais suscetível a ação microbicida do NO (WILSON et al., 2008).

Esta capacidade de aumentar o vacúolo parasitóforo parece estar relacionada com o mecanismo de evasão do parasita à ação do NO. Sabendo-se que *Leishmania (L.) amazonensis* também é capaz de produzir NO em baixas quantidades por uma NOS constitutiva capturando o substrato da célula hospedeira, é possível que exista uma correlação entre a capacidade de sobrevivência deste parasita com a produção de NO. A produção de NO em maiores concentrações, por esta espécie, pode representar uma tentativa do parasita em modular a resposta microbicida exacerbada, através da depleção do substrato L-arginina.

Souza e colaboradores (2010) observaram que em isolados de pacientes com *Leishmania (V.) braziliensis* existe uma correlação entre a capacidade de resistir à ação do NO com a de resistir a terapia por antimônios. Além disso, Holzemuller e

colaboradores (2005) observaram que *Leishmania (L.) i. chagasi* resistente ao antimônio trivalente *in vitro* também é mais resistente a um doador de NO exógeno e a morte celular no interior de macrófagos.

Nossos resultados sugerem que a produção de NO por diferentes espécies de *Leishmania* possa modular a produção de NO da célula hospedeira, capturando o substrato L-arginina e privando o macrófago de sintetizar seu NO reativo. Este mecanismo pode estar relacionado com a capacidade do protozoário em resistir a resposta microbicida do macrófago e assim direcionar o curso da doença.

6 CONCLUSÕES

- As espécies *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis* são capazes de produzir NO in vitro através de uma forma constitutiva da NOS.
- A espécie *Leishmania (L.) amazonensis* produziu maior quantidade de NO em comparação com a espécie *Leishmania (V.) braziliensis*.
- A enzima cNOS está presente em organelas glicossomais de promastigotas de ambas as espécies de *Leishmania*.

REFERÊNCIAS

- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J**, v. 357, p. 593-615, 2001.
- AMBROSIO, A. R.; DE MESSIAS-REASON, I. J. T. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Interaction of mannose-binding lectin with surface glycoconjugates and complement activation. An antibody-independent defence mechanism. **Parasite Immunol**, v. 27, p. 333-340, 2005.
- ASSCHE, T. V. et al. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radic Biol Med**, v.15, p. 337-351, 2011.
- BALANÑA-FOUCE, R. et al. Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. **Mol Biochem Parasitol**, v. 181, p. 85-93, 2011.
- BOGDAN, C. et al. Fibroblasts as host cells in latent Leishmaniasis. **J Exp Med**, v. 191, p. 2121-2129, 2000 (A).
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunol Rev**, v. 173, p. 17-26, 2000 (B).
- BALESTIERI, F. M. et al. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes infect**, v. 4, p. 23-29, 2002.
- BARRETO-BERGTER; VERMELHO, A. B. Structures of glycolipids found in trypanosomatids: contribution to parasite functions. **Open Parasitol J**, v. 4, p. 84-97, 2010.
- BASU, N. K. et al. Isolation of a nitric oxide synthase from the protozoan parasite *Leishmania donovani*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 156, pag. 43-47, 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS/Indicadores e dados básicos (IDB). Indicadores de Morbidade - Leishmaniose Tegumentar Americana, 2013.
- CARVALHO, E. M. et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop**, v. 56, p. 315-325, 1994.
- CASTES, M. et al. Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. **Biol Res**, v. 26, p. 233-238, 1993.
- COSTA, J. M. et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia Brazil: a report of eight cases. **J Trop Med Hyg**, v. 89, p. 319-323, 1986.
- COUTINHO, S. G. et al. T cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. **Exp Parasitol**, v. 84, p. 144-155, 1996.

DA SILVA, E. R. et al. Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and subcellular localization of native enzyme. **Mol Biochem Parasitol**, v. 159, p. 104-111, 2008.

DA SILVA, M. F. L. et al. *Leishmania amazonensis* Arginase compartmentalization in the glycosome is important for parasite infectivity. **PLoS ONE**, v. 7, 2012.

DEGROSSOLI, A. et al. The influence of low oxygen on macrophage response to *Leishmania* infection. **Scand J Immunol**, v. 74, p. 165-175, 2011.

DAFF, S. NO synthase: structures and mechanisms. **Nitric Oxide**, v. 23, p. 1-11, 2010.

ELFERING, L. S.; SARKELA, T. M.; GIULIVI, C. Biochemistry of mitochondrial nitric oxide synthase. **J Biol Chem**, v. 11, p. 38079-38086, 2002.

FARIAS, L. H. et al. Phosphatidylserine exposure and surface sugars in two *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains involved in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 207, p. 537-543, 2013.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients – a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 443-457, 2002.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev Ass Med Brasil**, v. 46, p. 265-271, 2000.

FRITZSCHE, C.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. Endothelial nitric oxide synthase limits the inflammatory response in mouse cutaneous leishmaniasis. *Immunobiology*, v. 215, p. 826-832, 2010.

GENESTRA, M. et al. Comparative analysis of the nitric oxide production by *Leishmania* sp. **Med Microbiol Immunol**, v. 192, p. 217-223, 2003.

GENESTRA, M. et al. Nitric oxide biosynthesis by *Leishmania amazonensis* promastigotes containing a high percentage of metacyclic forms. **Arch Microbiol**, v. 185, p. 348-354, 2006.

GLOBAL HEALTH – DIVISION OF PARASITIC DISEASES AND MALARIA, 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em: 30 de setembro de 2014. Com adaptações.

GREGORY, D. J.; OLIVIER, M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. **Parasitology**, v. 130, p. 27-35, 2005.

GUEIRARD, P. et al. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. **Cell Microbiol**, v. 10, p. 100-111, 2008.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, p. 1191-1199, 1999.

- HOLZEMULLER, P. et al. *Leishmania infantum* amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: Impact on in vitro parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities. **Infect Genet Evol**, v. 6, p. 187-197, 2005.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, p. 604-615, 2011.
- KONTUREK, S. K; KONTUREK, P. C. Role of nitric oxide in the digestive system. **Digestion**, v. 56, p. 1-13, 1995.
- KROPF et al. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. **FASEB J**, v. 19, p. 1-25, 2005.
- LINA, Ma. et al. An evolutionary analysis of tripanosomatid GP63 proteases. **Parasitol Res**, v. 109, p. 1-10, 2011.
- LOWENSTEIN, C. J.; SNYDER, S. H. Nitric oxide, a novel biologic messenger. **Cell**, v. 70, p. 705-707, 1992.
- MAGILL, A. J. Epidemiology of the leishmaniasis. **Dermatol Clin**, v. 13, p. 505-523, 1995.
- MELOS, J. L. R.; ECHEVARRIA, A. Sistemas enzimáticos de tripanossomatídeos como potenciais alvos quimioterápicos. **Rev virt Quim**, v. 4, p. 374-392, 2012.
- MUKBEL, R. M. et al. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **Am J Trop Med Hyg**, v. 76, p. 669-675, 2007
- OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, p. 293-305, 2005.
- OPPERDOES, F. R.; COOMBS, G. H. Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. **Trends Parasitol**, v. 23, p. 149-158, 2007.
- PARSONS, M. Glicosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. **Mol Microbiol**, v. 53. p. 717-724, 2004.
- PAVETO, C. et al. The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**, v. 270, p. 16576-16579, 1995.
- PEREIRA, C. et al. Control of *Trypanosoma cruzi* epimastigote motility through the nitric oxide pathway. **J Eukaryot Microbiol**, v. 44, p. 155-156, 1997.
- PETERS, N. C. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, p. 970-974, 2008.

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; RADI, R. L-Arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, p. 7301-7306, 2001.

PINTO-DA-SILVA, L. H. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complement resistant and highly infective for macrophages in vitro and hamsters in vivo. **Int J Parasitol**, v. 32, p. 1371-1377, 2002.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Macrophage interaction with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **J Immunol**, v. 172, p. 4454-4462, 2004.

ROBERTS, S. C. et al. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. **J Biol Chem**, v. 279, p. 23668-23678, 2004.

ROSTAMI, M. N. et al. CD8+ T Cells as a source of INF- γ productions in human Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, vol. 4, 2010.

SACKS, D. L: *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol*, v. 3, p. 189 -196, 2001.

SARKAR, A. et al. Monitoring of intracellular nitric oxide in leishmaniasis: Its applicability in patients with visceral leishmaniasis. **Cytometry A**, v. 79, p. 35-45, 2010.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. O. P. Clinical and immunopathological spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 239-251, 2004.

SILVEIRA, F. T. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) na Amazônia, Brasil: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Gaz med Bahia**, v. 79, p. 25-29, 2009.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v. 31, p. 423-431, 2009.

SOUZA, A. S. et al. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF- α production. **BMC Infect Dis**, v. 10, p. 1-11, 2010.

TEIXEIRA, D. E. et al. **Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania***. Fundação CECIERJ/Consórcio CEDERJ, 2013.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. **Infect Immun**, v. 70, p. 4177-4184, 2002.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting edge: Neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. **J Immunol**, v. 173, p. 6521-6525, 2004.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, p. 13837-13842, 2006.

WANASEN, N.; SOONG, L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against Leishmania infection. **Immunol Res**, v. 41, p. 15-25, 2009.

WILSON, J. et al. Control of parasitophorous vacuole expansion by *LYST/Beige* restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*. **PLoS Pathog**, Vol. 4, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of the Leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**, p. 22-26, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **LEISHMANIOSES: Informe epidemiológico das Américas**, v. 2, 2014.

ZHOU, L.; ZHU, D. Y. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. **Nitric Oxide**, v. 20, p. 223-230, 2009.