

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Influência da manutenção de *Leishmania (Leishmania)*
amazonensis em meio de cultura axênico sobre a
infecciosidade dos parasitos e sua correlação com a atividade
ecto-nucleotidásica**

Autora: Elisangela Aparecida de Assis

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração:
Imunobiologia de Protozoários.

Ouro Preto, Maio de 2008.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunoparasitologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), sob orientação do Professor Doutor Luís Carlos Crocco Afonso e com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*“Valeu a pena? Tudo vale a pena
se a alma não é pequena.”*

(Fernando Pessoa).

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Aparecida e Miguel, pelo amor e
incentivo em todos os momentos.**

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Luís Carlos Crocco Afonso pela oportunidade que me foi dada. Muito obrigada pela orientação, pela compreensão e pelas palavras de incentivo. Obrigada por ter acreditado que daria certo e por ter conduzido o trabalho com tamanha sabedoria.

Ao Dr. Eduardo A. Marques da Silva pela paciência e boa vontade. Obrigada por me ensinar as técnicas necessárias para a realização deste trabalho.

A Roberta Passamani, Jamile Camargos, William Santos e Fernanda Marim por participarem de forma tão significativa na realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do NUPEB.

Ao Leandro e ao Marcorélio por disponibilizarem os materiais necessários para a realização dos experimentos.

A todos os colegas do LIP.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus e a todos os “mensageiros de luz” que me guiaram durante a caminhada.

Aos meus pais, Maria Aparecida e Miguel, pelo apoio, carinho e dedicação. Obrigada por vocês me mostrarem sempre o melhor caminho e por tornarem possível a realização desta etapa. Obrigada mãe pela compreensão, pela paciência e pelo incentivo em todos os momentos.

A minha irmã Evelange e ao meu irmão Miguel pela união, pela força e por fazerem parte desta conquista.

As minhas tias Anna Maria e Josefina por participarem da realização de nossos sonhos.

A Maria Helena Soares Dulci pela amizade e pelas palavras incentivadoras.

Ao Sérgio pelo carinho, pela paz e harmonia em momentos tão especiais.

A Flávia, Marcela e Priscila pela convivência.

ÍNDICE

<i>DEDICATÓRIA</i>	III
<i>AGRADECIMENTOS</i>	V
<i>AGRADECIMENTOS ESPECIAIS</i>	VI
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	VIII
<i>LISTA DE SIGLAS</i>	X
<i>RESUMO</i>	XII
<i>ABSTRACT</i>	XIII
<i>INTRODUÇÃO</i>	15
<i>OBJETIVO GERAL</i>	28
<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	30
<i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	32
<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	40
<i>CONCLUSÃO</i>	67
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1) Curva de desenvolvimento de lesão em camundongos C57BL/6.....	40
Figura 2) Parasitismo em lesão de camundongos C57BL/6.....	41
Figura 3) Manutenção de parasitos em cultura por várias passagens altera a capacidade de hidrolisar nucleotídeos.....	42
Figura 4) Produção de IFN- γ por células de linfonodos e esplenócitos de camundongos C57BL/6 após 8 semanas de infecção com <i>L. amazonensis</i>	46
Figura 5) Manutenção de parasitos em cultura altera a porcentagem de formas metacíclicas em cultura.....	48
Figura 6) Metaciclogênese e o metabolismo de nucleotídeos.....	50
Figura 7) Curva de desenvolvimento de lesão em camundongos C57BL/6 inoculados com formas promastigotas metacíclicas de <i>L. amazonensis</i>	53
Figura 8) Parasitismo de lesão ocasionada por formas promastigotas metacíclicas.....	53
Figura 9) Formas promastigotas metacíclicas de <i>L. amazonensis</i> modulam a produção de citocinas nos camundongos C57BL/6.....	55
Figura 10) Manutenção de parasitos em cultura e hidrólise de nucleotídeos.....	56

Figura 11) Tratamento com adenosina influencia o metabolismo de nucleotídeos.....59

Figura 12) Tratamento com adenosina e o desenvolvimento de lesão na pata de camundongos C57BL/6.....60

Figura 13) Tratamento com adenosina e o parasitismo em lesão de pata de camundongos C57BL/6.....61

Figura 14) Tratamento com adenosina em cultura x produção de IFN- γ por células de linfonodos e esplenócitos de camundongos C57BL/6 após 8 semanas de infecção com *L. amazonensis*63

LISTA DE SIGLAS

ABTS: ácido 2,2' –bis – azino (3 – etilbenzil-thiazol- 6 – sulfônico)

ADP: difosfato de adenosina

AMP: monofosfato de adenosina

ATP: trifosfato de adenosina

CD39: apirase

CD73: 5' nucleotidase

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Médium*

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

E-NTPDase: ectonucleosídeo 5' -trifosfato difosfohidrolase

HCl: ácido clorídrico

HEPES: *N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid*

IFN- γ : *interferon gamma*

IL: interleucina

iNOS: enzima óxido nítrico sintase induzível

LPG: lipofosfoglicano

MHC I e II: complexo de histocompatibilidade principal I e II

NF- κ B: fator nuclear kappa B

NK: *natural killer*

NO: óxido nítrico

SDS: dodecil sulfato de sódio

LISTA DE SIGLAS

TCD4+: linfócitos auxiliares CD4+

TCD8+: linfócitos citotóxicos CD8+

TCR: receptor de células T

TGF- β : fator de transformação do crescimento beta

TRIS: *Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane*

RESUMO

Parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* quando são mantidos em cultura por passagens sucessivas apresentam redução na infecciosidade. As cepas infectantes dos parasitos possuem maior atividade ecto-nucleotídica do que as não infectantes. Para avaliar a existência de correlação entre o tempo de manutenção em cultura, a infecciosidade e a hidrólise de nucleotídeos em *Leishmania amazonensis* o parasito citado foi mantido em cultura por passagens sucessivas. Os parasitos mantidos em cultura por poucas passagens ($p < 15$) apresentaram maior hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP e maior porcentagem de formas infectantes quando comparados com aqueles mantidos em cultura por várias passagens ($p > 100$). Para avaliar o curso da infecção causada por passagens diferentes do parasito, os camundongos C57BL/6 foram inoculados na pata com formas promastigotas totais ou metacíclicas. O curso da infecção foi acompanhado por um período de oito semanas. Os camundongos inoculados com os parasitos mantidos em cultura por poucas passagens desenvolveram lesões maiores e produziram IFN- γ em menor quantidade quando comparados com o grupo de animais que recebeu o inóculo dos parasitos mantidos em cultura por várias passagens. Não foi verificada a produção de IL-4.

O re-isolamento de parasitos, dos animais inoculados com os parasitos mantidos em cultura por várias passagens, mostra que apenas uma passagem pelo hospedeiro vertebrado não alterou a atividade ecto-nucleotídica. O observado indica que a manutenção dos parasitos em cultura pode selecionar aqueles que apresentam reduzida atividade ecto-nucleotídica.

O tratamento dos parasitos mantidos em cultura por poucas passagens com adenosina causou alteração no metabolismo de nucleotídeos e na infecciosidade dos mesmos.

Os dados sugerem a existência de correlação entre o tempo de manutenção em cultura, a infecciosidade e a atividade ecto-nucleotídica em *L. amazonensis*.

ABSTRACT

It is usually accepted that maintenance of *Leishmania* parasites in culture leads to a decrease in the parasite's ability to cause infection in the vertebrate host. Previous work from our laboratory suggests that the infectivity of different *Leishmania* species correlates with the level of ecto-nucleotidasic activity. Studies from other laboratories, also demonstrated that no infectivity strains of *Leishmania amazonensis* have decreased apirasic activity. Based on these evidences, the present study evaluated the correlation between the maintenance of *L. amazonensis* in culture for several passages (>100), the ecto-nucleotidasic activity, its infectivity and the immune response induced by the infection in C57BL/6 mice.

Our results show that long term culture of *L. amazonensis* not only leads to decreased metacyclogenesis but, more importantly, that these parasites present reduced ecto-nucleotidasic activity. This decreased infectivity is associated with a decrease in IFN- γ production by lymph node and spleen cells. Furthermore, re-isolation of long term cultured parasites from lesions of infected mice did not recover the level of ecto-nucleotidasic activity. Finally, we show that treatment of *L. amazonensis* promastigote cultures with adenosine leads to a decreased ability to hydrolyze extracellular ATP and ADP and that infection by these parasites resulted in decreased lesion development.

Our results reinforce the hypothesis that infectivity by *Leishmania* parasites is, at least, partially dependent on the activity of ecto-nucleotidases.

INTRODUÇÃO

“... Mas é preciso ter força... É preciso ter graça, É preciso ter sonho sempre ...”

(Milton Nascimento e Fernando Brant).

INTRODUÇÃO

Leishmaniose

As Leishmanioses compreendem um grupo de doenças causadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania* (Ross, 1903). A doença exibe amplas manifestações clínicas em humanos, que são dependentes das espécies responsáveis por iniciar a infecção, do status imunológico e da composição genética do hospedeiro vertebrado (Alexander e cols., 1999; Cunningham, 2001; Oliveira e cols., 2004; Moura e cols., 2005).

Todas as formas de leishmaniose são transmitidas aos hospedeiros vertebrados (mamíferos) através da picada de fêmeas de insetos hematófagos. Os insetos transmissores dos parasitos são flebotomíneos (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) pertencentes ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e ao gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo. Eles são pequenos e possuem hábitos crepusculares ou noturnos (Lainson & Shaw, 1987; Killick –Kendrick, 1987; Ashford, 2000).

As Leishmanioses estão amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, desde as florestas úmidas do continente americano até os desertos da Ásia ocidental (Cunningham, 2001).

A distribuição geográfica das variadas formas clínicas da doença é dependente dos insetos vetores, dos hospedeiros reservatórios e notavelmente de fatores associados a vegetação e ao clima de cada região (Ashford, 2000).

Segundo a WHO (2007) as leishmanioses são prevalentes em toda parte do mundo e mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea são constatados em países como Afeganistão, Arábia Saudita, Algéria, Brasil, Irã, Iraque, Síria e Sudão, enquanto as formas clínicas classificadas como mucocutânea e visceral são encontradas principalmente em países da América Latina e na Índia.

Ciclo biológico

Os parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* apresentam um ciclo de vida digenético, no qual é possível notar a alternância entre dois estágios distintos do parasito (Desconteaux & Turco, 1999; Handman & Bullen, 2002; Kavoosi e cols., 2006).

O estágio denominado amastigota é encontrado no interior de fagolisossomos de macrófagos do hospedeiro vertebrado. Este estágio é caracterizado por apresentar formato esférico, ter aproximadamente 2,5 a 5 μ de diâmetro e não ser móvel (Desconteaux & Turco, 1999; Alexander & Russell, 1992).

Os insetos ao realizarem repasto sanguíneo ingerem as formas amastigotas contidas em macrófagos e monócitos da pele do indivíduo infectado. Estas formas são liberadas no intestino do inseto onde passam por diferenciação e dão origem às formas promastigotas (Desconteaux & Turco, 1999).

Sabe-se que formas promastigotas presentes no organismo do hospedeiro invertebrado possuem grandes quantidades de LPG e gliconjugados em sua superfície, ambos protegem os parasitos da ação de enzimas hidrolíticas presentes no intestino do inseto (Cunningham, 2001).

As formas promastigotas procíclicas, têm baixa infecciosidade (Zandbergen e cols., 2006), passam por um processo denominado metaciclogênese no qual se transformam em formas promastigotas metacíclicas, que correspondem as formas infectantes dos parasitos. Ao se tornarem infectantes estas formas separam-se do epitélio intestinal do inseto e migram para a faringe e cavidade bucal do hospedeiro invertebrado. Ao realizar novo repasto sanguíneo o hospedeiro invertebrado é capaz de transmitir as formas infectantes do parasito ao hospedeiro vertebrado (Cunningham, 2001).

O ciclo no hospedeiro vertebrado é iniciado quando o inseto vetor, ao realizar o repasto sanguíneo injeta as formas promastigotas metacíclicas junto com a saliva (Oliveira e cols., 2004).

As formas promastigotas infectantes ao entrarem em contato com o hospedeiro vertebrado podem evadir da destruição ocasionada pela resposta imune por intermédio do processo de fagocitose e nos fagolisossomos elas se diferenciam nas formas amastigotas. Sabe-se que o crescimento intracelular dos parasitos está associado à capacidade que eles têm de escapar da resposta imunológica do hospedeiro (Bogdan & Röllinghoff, 1999). A proliferação das formas amastigotas pode causar a ruptura dos macrófagos infectados, e ao serem liberadas podem infectar macrófagos vizinhos e conseqüentemente reiniciar o ciclo biológico no mamífero (Cunningham, 2001).

A interação parasito- hospedeiro vertebrado

As formas promastigotas metacíclicas resistem à lise mediada pelo complemento e utilizam dessa vantagem para interagir com os macrófagos (Cunningham, 2001; Descontaux & Turco, 1999; Da Silva e cols., 1989; Mosser & Edelson, 1985). A resistência à lise está associada às modificações que ocorrem na estrutura da molécula de LPG presente na superfície das formas infectantes. A metaloprotease gp63 presente na superfície das células promastigotas também previne a lise mediada pelo complemento, pois impede a deposição de C_{3b} na superfície dessas células e impede a formação de C₅ convertase (Cunningham, 2001).

A fagocitose das formas promastigotas infectantes no sítio de inoculação é realizada por células fagocíticas mononucleares. O primeiro passo neste processo de disseminação envolve células dendríticas de Langerhans na epiderme, que migram para derme e em seguida para o linfonodo drenante em resposta à produção de citocinas pró-inflamatórias (Weigle & Saravia, 1996).

Os macrófagos e monócitos podem disseminar parasitos diretamente para o sistema circulatório e para compartimentos retículo-endoteliais (Weigle & Saravia, 1996). Parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* têm sido observados em culturas de sangue periférico, baço e medula óssea de pacientes com diferentes formas de Leishmanioses, causadas por espécies associadas com a forma cutânea da doença (Weigle & Saravia, 1996; Martinez e cols., 1992; Bowdre e cols., 1981; Nuwayri-Salti e cols., 1992).

Formas Clínicas

As Leishmanioses são caracterizadas por manifestações clínicas divergentes que são dependentes das características genéticas dos hospedeiros e também das espécies do parasito responsáveis pelo início da infecção (Alexander & Bryson, 2005). De acordo com Ashford (2000) no gênero *Leishmania* é encontrado um grande número de espécies causadoras da doença em humanos.

As principais formas clínicas de Leishmanioses em humanos podem ser classificadas como: cutânea, mucocutânea, cutânea difusa, visceral ou Kala azar (Ashford, 2000).

A forma cutânea pode ser causada por parasitos pertencentes às espécies *Leishmania tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* e *L. braziliensis* (Ashford., 2000). No Brasil as espécies mais importantes são: *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (Ministério da Saúde, 2002).

De acordo com dados do Ministério da Saúde (2002) a forma cutânea da doença apresenta-se classicamente por pápulas, que evoluem para úlceras indolores, únicas ou múltiplas, com bordas elevadas e fundo granuloso. Também pode manifestar-se como placas verrucosas, papulosas, localizadas ou difusas. A forma mucosa, secundária ou não à cutânea, caracteriza-se por infiltração, ulceração e destruição dos tecidos da cavidade nasal, faringe ou laringe. Quando a destruição dos tecidos é importante, podem ocorrer perfurações do septo nasal e/ou palato.

A forma mucocutânea é causada principalmente por parasitos pertencentes à espécie *L. braziliensis* (Marzochi & Marzochi, 1994; Ashford, 2000, Camargo & Langoni, 2006). Nesta forma é observado o surgimento de uma ulceração cutânea primária, no local de picada do inseto, seguida da distribuição linfática ou hematogênica dos parasitos no organismo do hospedeiro vertebrado (Bowdre e cols., 1981; Ashford, 2000). Uma característica desta forma clínica é a cura aparente da lesão inicial e alguns anos depois o surgimento de lesões na boca e mucosa nasal que podem evoluir e destruir as mucosas e cartilagens afetadas (Ashford, 2000).

A forma clínica cutânea difusa de Leishmaniose pode ser causada pelos parasitos pertencentes às espécies *L. aethiopica* ou *L. amazonensis* (Ashford, 2000). Ela é caracterizada pelo surgimento de nódulos não ulcerados com aspecto de lepromatoso. A avaliação histopatológica dos macrófagos demonstra a presença de elevada carga parasitária (Convit e cols. , 1972).

No Brasil as formas clínicas que acometem o tegumento são encontradas em todos os estados, constituindo, portanto, uma das afecções dermatológicas que merece maior atenção, devido à magnitude da doença, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que podem produzir no homem, como também pelo envolvimento psicológico do doente, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (FUNASA, 2000).

A forma visceral, conhecida pelo nome de kala-azar, é causada por *L. donovani* ou *L. infantum*, porém há informações que *L. tropica* e *L. amazonensis* poderiam estar associadas ao desenvolvimento da forma visceral da doença (Mebrahtu e cols., 1993; Barral e cols., 1991; Weigle & Saravia, 1996; Ashford, 2000). Os pacientes acometidos pela doença podem apresentar: períodos prolongados de febre, anemia, perda de peso e apetite e hepatoesplenomegalia (Singh & Sivakumar, 2004).

A espécie *L. amazonensis* já foi isolada de lesões cutâneas simples, cutânea difusa e mucosa, bem como de baço e medula óssea de pacientes que desenvolveram a forma visceral da doença no Brasil (Weigle & Saravia,1996). A visceralização de espécies dermatrópicas do parasito tem sido relatada como uma complicação de condições imunossupressoras como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)(Singh & Sivakumar, 2004).

Modelo experimental

O desenvolvimento de uma resposta imunológica pelo organismo do hospedeiro é algo relevante para a progressão ou cura da doença. Para compreender os mecanismos imunológicos utilizados pelos hospedeiros, têm sido usados modelos experimentais onde as formas clínicas da doença possam ser reproduzidas.

Diferentes linhagens de camundongos são geneticamente susceptíveis ou resistentes aos parasitos e há diferenças entre as respostas de algumas linhagens para diferentes espécies de *Leishmania* (Wilson e cols., 2005). Camundongos pertencentes às linhagens CBA, C3H, C57BL/6 (B6), B10.22 quando infectados com *L. major* desenvolvem lesões cutâneas que curam espontaneamente enquanto camundongos pertencentes as linhagens BALB/c, SWR/J, DBA/2 e A/J apresentam lesões primárias que são propensas a disseminação. O uso de modelos experimentais permite a compreensão de alguns aspectos imunológicos relacionados à Leishmaniose (Aguilar Torrentera e cols., 2002).

Resposta imune

O parasitismo intracelular por protozoários e bactérias é considerado uma estratégia de sobrevivência para os parasitos, pois devido à localização no organismo do hospedeiro conseguem ser protegidos da ação dos mecanismos de resposta imune humoral (Overath & Aebischer, 1999).

A natureza da célula hospedeira e a localização subcelular do patógeno determinarão se a apresentação do antígeno será feita preferencialmente via complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC I) ou II (MHC II) (Overath & Aebischer, 1999). A infecção de fagócitos mononucleares com parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* resulta em uma resposta imune deficiente em IFN- γ , na diminuição da expressão de genes do MHC II e alteração dos mecanismos intracelulares induzidos por IFN- γ (Ray e cols.; 2000).

A resposta imune eficiente contra parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* é mediada por células. Os parasitos escapam da resposta imune humoral dos hospedeiros por residirem nos fagolisossomos situados nos macrófagos (Cunningham, 2001).

As Células de Langerhans da epiderme fazem parte de uma família de células dendríticas derivadas da medula óssea que coletivamente, são definidas como processadoras e apresentadoras profissionais de antígenos. Elas atuam como sentinelas do sistema imune adaptativo. Suas funções são iniciar a amostragem dos antígenos no microambiente de infecção e encaminhar os antígenos para os linfonodos regionais (Griffiths e cols., 2005).

A infecção de macrófagos residentes no sítio de infecção por parasitos do gênero *Leishmania* permite que a maioria dos patógenos seja lisada neste local. A lise dos parasitos promove a liberação de proteínas que serão processadas via MHC II nas células de Langerhans. Essas células dendríticas ao migrarem para os órgãos linfóides são responsáveis por iniciar a resposta imune mediada por células T (Overath & Aebischer, 1999).

A estimulação de diferentes subgrupos de células T CD4⁺ (células T auxiliares ou Th) é vista como condição primária para determinar a progressão da doença (Heinzel e cols., 1989; Scott, 1991; Scott e cols., 1988). Os subgrupos de células T são definidos de acordo com as citocinas produzidas (Fiorentino e cols., 1989; Mosmann e cols., 1986; Mosmann e cols., 1989).

As células T auxiliares desempenham uma função importante na resposta imune. A expansão de clones Th1 protege durante a infecção, enquanto a expansão de células Th2 exacerba a doença. A produção de IL-12 por células dendríticas causa a diferenciação de células T não estimuladas em células Th1 e induz a produção de IFN- γ por células T e células natural killer (NK) (Cunningham, 2001; Herwaldt, 1999; Kane & Mosser, 2000). IFN- γ e TNF- α , produzido pelos macrófagos infectados ativam o gene da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS), que resulta na produção de óxido nítrico (NO) que é tóxico para o parasito (Cunningham, 2001; Kane & Mosser, 2000).

A diferenciação de células T para o subgrupo Th2 é regulada pela citocina IL-4 que confere susceptibilidade a hospedeiros infectados por parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania*. IL-4 diminui a produção de IL-12, IFN- γ e a expressão do receptor para IL-12 e inibe a produção de óxido nítrico por macrófagos (Cunningham, 2001; Alexander e cols. 1999). Dados obtidos da literatura relatam que outras citocinas derivadas de macrófagos, como IL-6, IL-10 e TGF- β , são capazes de modular a

atividade leishmanicida de macrófagos e por isso exercem um papel importante durante o desenvolvimento das leishmanioses (Alexander e cols.1999).

Os mecanismos protetores ainda não estão bem estabelecidos para todos os casos de leishmaniose, mas existe um consenso que a interleucina 12 (IL-12) proveniente de células apresentadoras de antígenos e células dendríticas, possivelmente aumentada por citocinas como IL-1, IL-18, IL-23 e IL-27 dirigem a diferenciação e proliferação de células Th 1 e consequentemente o controle da infecção (Alexander & Bryson, 2005).

Nucleotídeos

Protozoários flagelados, unicelulares pertencentes à família Tripanossomatidae não são capazes de sintetizar purinas de novo (Conh & Gottlieb, 1997; Nakaar e cols., 1998; Berrêdo-Pinho e cols., 2001), logo eles são dependentes de fontes exógenas desses nutrientes para que possam sobreviver (Steiger & Steiger, 1977; Nakaar e cols., 1998).

Dados da literatura relatam que nucleotídeos são liberados para o meio extracelular quando insetos hematófagos realizam o repasto sanguíneo na pele do hospedeiro vertebrado (Ribeiro e cols. 2000) e consequentemente os danos celulares causados por traumas ou ação de patógenos no organismo do hospedeiro são responsáveis por aumentar a concentração de nucleotídeos no meio extracelular (Di Virgilio, 2005).

Nucleotídeos extracelulares não atravessam a membrana celular, mas são capazes de mediar ações biológicas por meio de receptores específicos situados na superfície das células. Duas classes principais de proteínas que se ligam a nucleotídeos foram identificadas: os receptores purinérgicos ou purinoreceptores e as ectonucleotidases (Dombrowsky e cols.; 1998, Meyer-Fernandes,2002).

Os receptores purinérgicos são proteínas transmembranas agrupadas de acordo com a ação farmacológica de numerosos nucleosídeos e nucleotídeos agonistas e antagonistas. Os receptores P1 se ligam à adenosina ou ao AMP e são responsáveis por mediar os efeitos via proteína G. Os receptores P2 podem se ligar a ATP e ADP (Dombrowsky e cols.; 1998).

As ectonucleotidases estão presentes em vários tipos de células (Dombrowsky e cols.; 1995). Elas são proteínas transmembrana que se ligam a nucleotídeos extracelulares e são responsáveis pela catálise e hidrólise de nucleotídeos no espaço extracelular (Dombrowsky e cols.; 1998). A família das ecto-ATPases (E-NTPDase) possui dois grupos de enzimas importantes: ATP difosfohidrolases (ATPDases ou apirases) que hidrolisam ATP e ADP e as ecto-enzimas ecto-ATPases, ecto-ADPases que hidrolisam ATP ou ADP respectivamente (Meyer-Fernandes, 2002). A ecto-enzima 5' nucleotidase, é responsável pela hidrólise de AMP a adenosina no meio extracelular (Plesner, 1995; Dombrowsky e cols.; 1998).

As atividades de enzimas especializadas no metabolismo de ATP foram identificadas em diferentes células e tecidos de várias espécies de animais (Plesner, 1995) e também na superfície celular de parasitos pertencentes aos gêneros *Toxoplasma* (Nakaar e cols., 1998), *Leishmania* (Meyer-Fernandes e cols., 1997; Berrêdo-Pinho e cols., 2001; Peres-Sampaio e cols., 2001), *Entamoeba* (Barros e cols., 2000), *Trichomonas* (Jesus e cols., 2002) e *Crithidia* (Lemos e cols., 2002). Em alguns desses parasitos, a atividade ecto-ATPásica é associada com a virulência e a evasão dos protozoários dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Barros e cols., 2000; Berrêdo-Pinho e cols. 2001).

As formas promastigotas virulentas de *L. amazonensis* apresentaram maior atividade ecto-ATPásica quando comparadas com as formas promastigotas avirulentas, esta observação sugere a influência do metabolismo de nucleotídeos na virulência dos parasitos (Berrêdo-Pinho e cols., 2001)

As informações obtidas na literatura sugerem que as ecto-nucleotidases são importantes para o estabelecimento de infecções causadas por endoparasitos, pois são responsáveis por desativar respostas protetoras do hospedeiro que necessitam da participação de nucleotídeos (Vasconcelos e cols., 1993, 1996; Matos e cols., 2001; De Marco e cols., 2003; Fietto e cols., 2004), porém a manutenção dos parasitos em cultura pode interferir na atividade ecto-ATPasica. Meyer-Fernandes e cols. (2002) relataram que a atividade ecto-ATPasica de um isolado primário de *T. vaginalis* foi mais elevada do que a verificada em um isolado mantido 'in vitro' por muitos anos.

As várias espécies de parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* possuem adaptações específicas para sobreviverem nos organismos dos hospedeiros invertebrados e vertebrados. Conseqüentemente diferentes fatores de virulência têm sido identificados para as espécies de *Leishmania spp.*

A presença de ATP no meio extracelular é responsável por estimular 'in vitro' a síntese de DNA em células da medula óssea e em timócitos, mas inibe a produção de DNA em células do baço, linfócitos e células mononucleares do sangue periférico. ATP pode ser uma das moléculas sinalizadoras envolvidas na citotoxicidade mediada por células (Meyer-Fernandes, 2002; Gordon 1986). O ATP extracelular é considerado uma molécula pró-inflamatória que induz agregação de neutrófilos e liberação de superóxido (Ford-Hutchinson, 1982; Kuroki & Minakami, 1989). O acúmulo de ATP no meio extracelular é capaz de estimular a secreção de citocinas e quimiocinas relacionadas com a resposta imune inflamatória desenvolvida pelo hospedeiro (Di Virgilio, 2005). ADP extracelular estimula a agregação de plaquetas (Ribeiro, 1987, 1995).

Adenosina e inosina exibem um potente efeito imunomodulador. Adenosina suprime a produção de citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF- α) e IL-12 e aumenta a produção de IL-10 por monócitos e macrófagos (Gounaris & Selkirk, 2006). Sabe-se que adenosina tem ação vasodilatadora e impede a agregação de plaquetas (Collis, 1989; Edlund e cols., 1987). O acúmulo de adenosina no meio extracelular induz a imunomodulação, pois esta molécula é tóxica para o desenvolvimento de linfócitos (Dombrowsky e cols.; 1998). A adenosina presente no meio extracelular pode ser transportada para dentro do citoplasma e incorporada pela célula através da via de captação de purinas (Dombrowsky e cols.; 1998).

L. amazonensis é uma espécie pertencente ao complexo Mexicana e é responsável por causar infecções crônicas na maioria das linhagens de camundongos (McMahon-Pratt & Alexander, 2004).

Afonso & Scott (1993) relataram que a susceptibilidade de camundongos C57BL/10 a *L. amazonensis* não é exclusivamente controlada por células Th2. Camundongos C57BL/6 deficientes em IL-4 permaneceram susceptíveis a infecção causada por *L. amazonensis* (McMahon-Pratt & Alexander, 2004).

Jones e cols. (2000) descreveram o decréscimo da expressão do receptor $\beta 2$ para IL-12 (IL-12 β_2) em células T CD4⁺ de camundongos C3H infectados com *L. amazonensis*, bem como em células T CD4⁺ de camundongos C57BL/6 IL-4^{-/-}, o que sugere um mecanismo independente de IL-4 responsável pela reduzida resposta de IL-12 e conseqüentemente por prejudicar a resposta Th1 em hospedeiros infectados com *L. amazonensis*. O tratamento dos animais com IFN- γ (Barral-Netto e cols., 1996) ou IL-12 (Jones e cols., 2000) não tiveram efeitos significantes no curso da infecção por *L. amazonensis*. Os dados sugerem que os mecanismos responsáveis pela susceptibilidade de camundongos para espécies de parasitos existentes no Novo Mundo são complexos e precisam ser investigados (Ji e cols., 2003).

Dados da literatura demonstram que camundongos pertencentes à linhagem C57BL/6 são susceptíveis à infecção por *L. amazonensis* e desenvolvem lesões que são progressivas durante o curso de infecção quando comparadas com as lesões observadas em camundongos da mesma linhagem que receberam inóculo contendo *L. braziliensis* (Afonso & Scott, 1993; Maioli e cols., 2004; Ji e cols., 2005). A capacidade de metabolizar nucleotídeos extracelulares tem sido alvo de estudo em *L. amazonensis*, pois já foi constatada a presença de atividade ecto-ATPásica e que as formas promastigotas virulentas do parasito apresentam maior atividade ectoATPásica do que as formas promastigotas avirulentas (Bêrredo-Pinho e cols., 2001).

A investigação dos fatores envolvidos na infecção causada por *L. amazonensis* é necessária para compreensão dos mecanismos responsáveis pela evasão do parasito ao sistema de defesa do hospedeiro. A atividade ecto-nucleotidásica, verificada nos parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania*, pode ser um dos fatores de virulência que

contribuem para a progressão da doença e modulação da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro vertebrado.

Diante das considerações o trabalho avaliará a existência de correlação entre o período de manutenção em cultura, a atividade ecto-nucleotidásica e a virulência dos parasitos pertencentes à espécie *L. amazonensis*.

OBJETIVO GERAL

OBJETIVO GERAL

* Avaliar a existência de correlação entre o tempo de manutenção em cultura, virulência e atividade ecto-nucleotidásica em *L. amazonensis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- * Avaliar o desenvolvimento de lesão e o nível de parasitismo tecidual causados pela infecção de camundongos C57BL/6 por promastigotas de fase estacionária e formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* mantidas em cultura por poucas (<15) ou muitas passagens (>100);
- * Verificar se a manutenção dos parasitos em cultura é capaz de alterar a atividade ecto-nucleotidásica;
- * Comparar a produção de citocinas, IFN- γ e IL-4 em sobrenadantes de células de linfonodos e baço de animais infectados por promastigotas de *L. amazonensis* mantidos em cultura por poucas ou várias passagens e estimuladas in vitro com antígenos homólogos;
- * Verificar se a passagem por camundongos C57BL/6 interfere na capacidade ecto-nucleotidásica de *L. amazonensis*;
- * Verificar se a indução de alteração da atividade ecto-nucleotidásica interfere com curso da infecção por *L. amazonensis*;

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Parasitas

Para realização dos experimentos foram utilizados parasitos pertencentes à espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, identificada como cepa IFLA/BR/1967/PH8. Os parasitos foram mantidos por cinco dias em meio de Grace (GIBCOBRL-Life Technologies, Grand Island, NY, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cripion-Biotecnologia-Andradina, SP, BR), 2mM de Glutamina (GIBCOBRL-Life Technologies, Grand Island, NY, MO, EUA) e 20µg/mL de Penicilina (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA).

Os parasitos mantidos por menos tempo em meio de cultura foram considerados de baixa passagem e não ultrapassaram a décima quinta passagem. Os parasitos de alta passagem foram considerados aqueles mantidos por mais tempo em meio de cultura e estavam acima da centésima passagem. De três em três dias eram feitas novas passagens dos parasitos utilizados.

As formas promastigotas totais, para inóculo, foram obtidas de culturas no quinto dia, lavadas em PBS, centrifugadas a 1540 x g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspendido em 5 mL de RPMI 1640, pH 7,2 (SIGMA- St. Louis, MO, EUA), para a contagem dos parasitos foi retirada uma alíquota desta suspensão que foi diluída em Formalina 4% (diluição 1:50) para a contagem em câmara de Neubauer. Ao final $1,0 \times 10^7$ parasitos / 40µL/ inóculo foram utilizados.

As formas promastigotas metacíclicas, para inóculo, foram obtidas por intermédio da técnica de separação por gradiente de Ficoll[®] PM 400 (Amersham Biosciences- Uppsala, Suíça) modificado. Os parasitos, mantidos em 150 mL de meio de cultura por poucas ou várias passagens, foram distribuídos em tubos de fundo cônico de 50 mL, centrifugados a 1540 x g por 10 minutos a 4°C e lavados duas vezes em PBS, pH 7,2. Os sobrenadantes foram descartados, os sedimentos contendo os parasitos foram reunidos em um tubo de fundo cônico de 50 mL e ressuspendidos em 10 mL de RPMI 1640, pH 7,2. Foram retiradas alíquotas de 2 mL para serem distribuídas em tubos de fundo cônico de 15 mL. Foi adicionado, ao fundo de cada tubo de 15 mL, um

volume de 2 mL de Ficoll 10%. Em seguida foi realizada a centrifugação da suspensão de parasitos a 1070 x g por 15 minutos a 25°C. Os sobrenadantes contendo as formas promastigotas metacíclicas foram coletados e transferidos para tubos nos quais foi adicionado RPMI 1640, pH 7,2 (q.s.p 30mL). Os tubos contendo os parasitos foram centrifugados a 1540 x g por 10 minutos a 4°C e em seguida lavados duas vezes em PBS, pH 7,2. Os parasitos foram ressuspensos em 3 mL de RPMI 1640, pH 7,2 e desta suspensão foi retirada uma alíquota que foi diluída em Formalina 4% (diluição 1:10) para a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer, em seguida a concentração foi ajustada para $1,0 \times 10^5$ parasitos/ 40 μ L/ inóculo.

Antígeno particulado

Os parasitos pertencentes à espécie *L. amazonensis* foram cultivados por cinco dias. No quinto dia os parasitos foram lavados por duas vezes em PBS, em seguida realizada contagem dos parasitos e os sedimentos armazenados a -20°C. Quando foram obtidos aproximadamente 10^{10} parasitos foi feita a lise por choque térmico dos mesmos. Neste caso, a lise por choque térmico consistiu em mergulhar o tubo que continha os parasitos em nitrogênio líquido até o congelamento, e em seguida mergulhá-lo em banho-maria a 37°C, por sete vezes. Uma amostra do lisado foi coletada para verificação do rompimento dos parasitos e para dosagem de proteínas segundo o método de Lowry (Lowry e cols., 1951). Levando-se em consideração o resultado da dosagem de proteínas, a concentração do antígeno foi ajustada para 1mg/mL. O material foi armazenado a -70°C até a utilização.

Hidrólise de nucleotídeos

Os parasitos mantidos em cultura por poucas ou várias passagens, de 5º dia de cultura, foram diluídos em salina e submetidos a duas centrifugações a 1540 x g por 10 minutos a 4° C. As formas promastigotas metacíclicas, na concentração de $2,5 \times 10^6$ parasitos/reação e as formas promastigotas totais na concentração de $5,0 \times 10^6$ parasitos/reação foram adicionadas ao tampão de atividade (NaCl 0,01M, KCl 0,005M, Glicose 0,005 M e MgCl₂ 0,005M em Hepes-Tris 0,05M, pH 7,2) e incubadas por 1 h a

30°C em presença de ATP, ADP ou AMP na concentração de 5mM para cada reação. A reação foi interrompida com a adição de 125 µL de HCl 0,2 N.

O acompanhamento de cada reação de hidrólise foi feito a partir de amostras que continham apenas o tampão de atividade e os respectivos nucleotídeos. Estas amostras foram incubadas por 1 h a 30°C e a adição dos parasitos ocorreu após a interrupção da reação com 125 µL de HCl 0,2 N. Os valores obtidos serviram de referência para o controle da reação.

Decorrido o tempo de incubação, os tubos correspondentes a cada reação foram centrifugados a 1540 x g por um período de 10 minutos e os sobrenadantes coletados para avaliar a hidrólise dos nucleotídeos.

Os sobrenadantes foram plaqueados em placa de 96 poços. A hidrólise dos nucleotídeos foi verificada pela quantidade de fosfato livre (Pi) existente nas amostras coletadas por meio de reação colorimétrica (Tausky e Shorr, 1953). O Ácido fosfórico 1mM foi o padrão utilizado para verificação da concentração de Pi livre nas amostras. Os limites de detecção foram 312,5 nmol Pi (máximo) e 1,2 nmol Pi (mínimo). Para leitura da reação foi utilizado o leitor Emax Molecular Devices (Molecular Devices Corporation - Sunnyvale, CA, USA) no comprimento de onda de 650 nm.

Os valores referentes à hidrólise dos nucleotídeos pelos parasitos foram subtraídos dos valores encontrados para o controle da reação referente a cada nucleotídeo. Os resultados obtidos foram multiplicados por fatores de correção para que pudessem ser equivalentes aos encontrados na hidrólise de nucleotídeos realizada por $1,0 \times 10^8$ parasitos após 1h de incubação a 30°C.

Camundongos

Os camundongos utilizados para realização dos experimentos foram fêmeas pertencentes à linhagem C57BL/6 com idade entre 4 e 8 semanas.

Os animais receberam inóculo no coxim plantar da pata posterior esquerda e foram mantidos durante sete ou oito semanas em gaiolas de plástico (30 cm de comprimento x 20 cm de largura x 13 cm de altura), contendo água e ração, no Biotério da Universidade Federal de Ouro Preto.

Curso de Infecção

Os experimentos de infecção foram feitos com quatro camundongos por grupo. Os animais foram inoculados com formas promastigotas totais ($1,0 \times 10^7$ parasitos/inóculo) ou com formas promastigotas metacíclicas ($1,0 \times 10^5$ parasitos/inóculo) de *L. amazonensis* mantidas em cultura por poucas ou várias passagens.

Os experimentos realizados com as formas metacíclicas tratadas ou não em cultura com adenosina 5mM (Sigma - St. Louis, MO, EUA) foram realizados com cinco animais por grupo e cada animal recebeu inóculo contendo $1,0 \times 10^5$ parasitos.

Semanalmente, foi feito o acompanhamento do tamanho da lesão através da avaliação da diferença encontrada entre as medidas das patas infectadas e não infectadas dos animais. O medidor utilizado foi um micrômetro marca Starret (Itu, São Paulo, SP, BR). O acompanhamento da lesão foi feito por oito semanas para os experimentos realizados com as formas promastigotas totais e formas promastigotas metacíclicas mantidas em cultura por poucas ou várias passagens. O curso de infecção com formas promastigotas metacíclicas mantidas em cultura por poucas passagens tratadas ou não com adenosina 5mM foi acompanhado durante sete semanas e ao final deste período os animais foram sacrificados.

O sacrifício dos animais foi por deslocamento cervical e foram coletados de cada animal: o baço, a pata infectada e o linfonodo poplíteo drenante da pata infectada.

Cultura de células e dosagem de citocinas

Os órgãos coletados (baços e linfonodos poplíteos) foram macerados em homogeneizador de vidro, ressuspensos em DMEM (Hyclone – Logan, Utah, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (Cripion Biotecnologia – Andradina, SP, Brasil), 2mM de Glutamina, 25mM de HEPES (Sigma – St. Louis, MO, EUA), 50µM de 2-mercaptoetanol (Pharmacia Biotech – Uppsala, Suíça) e 20µg/mL de Penicilina G, de forma a se obter a concentração de células equivalente a $5,0 \times 10^6$ células/mL.

As células foram plaqueadas em placas de cultura de 48 poços (0,5 mL /poço), e as amostras referentes ao grupo estimulado foram tratadas com 50µg/mL de antígeno particulado de *L. amazonensis*. Todas as amostras plaqueadas foram mantidas em estufa a 37°C, 5% CO₂.

Os sobrenadantes referentes às amostras obtidas foram coletados após 72 horas para dosagem de IL-4 e IFN-γ. A avaliação da produção de citocinas foi feita de acordo com a técnica de ELISA de captura (Afonso & Scott, 1993).

Para dosagem de IL-4 foram utilizados os anticorpos 11B11 e BVD6-biotina, a enzima estreptoavidina peroxidase (Zymed Laboratories, Inc. – So. São Francisco, CA, EUA) e para revelação ABTS e H₂O₂ diluídos em Tampão Citrato Fosfato, pH 4,0.

Para dosagem de IFN-γ usou-se o anticorpo R46A2 e o soro de coelho anti-IFN-γ murino, além do conjugado anti IgG de coelho peroxidase (Zymed Laboratories, Inc. – So. São Francisco, CA, EUA) e, para revelação, ABTS e H₂O₂ diluídos em Tampão Citrato Fosfato, pH 4,0.

Foram utilizados padrões de IL-4 e IFN-γ murino recombinantes (R & D Systems, Inc. – Minneapolis, MN, EUA) para cálculo das concentrações de citocinas. O limite de detecção foi de 30 pg/mL.

A leitura das amostras foi feita em leitor Emax Molecular Devices (Molecular Devices Corporation - Sunnyvale, CA, USA), sob comprimento de onda 405 nm.

Quantificação de parasitos

A quantificação de parasitos foi feita de acordo com a técnica de diluição limitante (Souza-Neto e cols., 2004).

As patas infectadas dos camundongos foram coletadas e esterilizadas em solução contendo detergente neutro e em seguida foram transferidas para tubos contendo álcool 70%, em cada solução as patas ficaram mergulhadas por 3 minutos. Foi feita a retirada da pele com a ajuda de um bisturi e cada uma das patas infectadas foi devidamente processada em homogeneizador de vidro contendo meio de Grace base e centrifugada a 50 x g por 1 minuto a 4°C.

O sobrenadante foi coletado em outro tubo e centrifugado a 1540 x *g* por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 0,5 mL de meio de Grace completo (meio de Grace suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2mM de Glutamina, e 20µg/mL de Penicilina G).

Foi feito o plaqueamento da suspensão de parasitos em placa de 96 poços estéril. Para isso, foram adicionados 200µL da suspensão citada acima, em duplicata, aos poços da primeira fileira da placa, posicionada verticalmente. Aos outros poços foram adicionados 180µL de meio de Grace completo e foram feitas diluições sucessivas 1:10 do primeiro poço até o décimo segundo poço, com o cuidado de trocar sempre as ponteiros após cada fileira homogeneizada.

As placas foram incubadas por 15 dias em estufa a 26°C e examinadas ao microscópio invertido para verificação da presença de parasitos. Os resultados foram expressos como -log do título de parasitos correspondente à última diluição na qual os parasitos foram detectados.

Análise Estatística

Para análise estatística dos dados foi utilizado o Teste *t* de Student, ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

(Fernando Pessoa).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para investigar a existência de correlação entre o tempo de manutenção dos parasitos em cultura, virulência, atividade ecto-nucleotidásica de *L. amazonensis* e os efeitos destes fatores na resposta imune desenvolvida pelos hospedeiros os camundongos C57BL/6 foram inoculados com os parasitos mantidos em cultura por poucas ($p < 15$) ou várias passagens ($p > 100$).

De acordo com os resultados, mostrados na figura 1, os camundongos inoculados com os parasitos mantidos em cultura por poucas passagens desenvolveram lesões maiores quando comparadas com as lesões desenvolvidas pelos camundongos que receberam o inóculo contendo os parasitos mantidos em cultura por várias passagens. É possível verificar que a partir da quarta semana a diferença existente entre o tamanho das lesões é estatisticamente significativa.

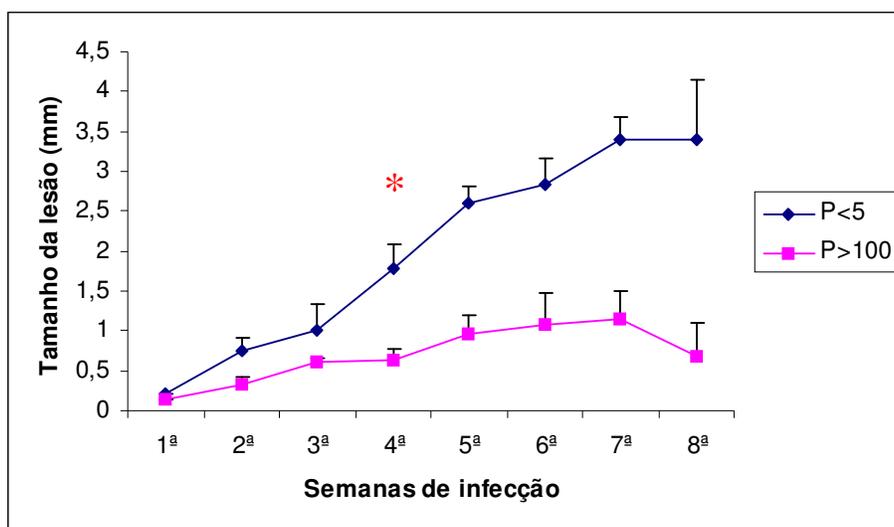


Figura 1-Curva de desenvolvimento de lesão em camundongos C57BL/6 inoculados com $1,0 \times 10^7$ promastigotas de *L. amazonensis*, mantidos em cultura por poucas ($p < 15$) ou várias passagens ($p > 100$), no coxim plantar da pata posterior esquerda. Os dados representam a média + desvio padrão dos valores obtidos para as lesões em 3 experimentos independentes. Em cada experimento foram utilizados 4 animais por grupo. (*) indica diferença estatisticamente significativa a partir da 4ª semana entre os grupos. ($p < 0,05$).

A quantificação dos parasitos, em lesão de pata, foi realizada ao final do curso de infecção. Os camundongos foram sacrificados na oitava semana após o inóculo dos parasitos e as patas utilizadas para realização da quantificação de parasitos pela técnica de diluição limitante. Os resultados representados na figura 2 mostram que não houve diferença estatisticamente significativa entre o parasitismo dos camundongos que receberam inóculo com os parasitos mantidos em cultura por poucas passagens quando comparado com o dos camundongos inoculados com os parasitos mantidos em cultura por várias passagens.

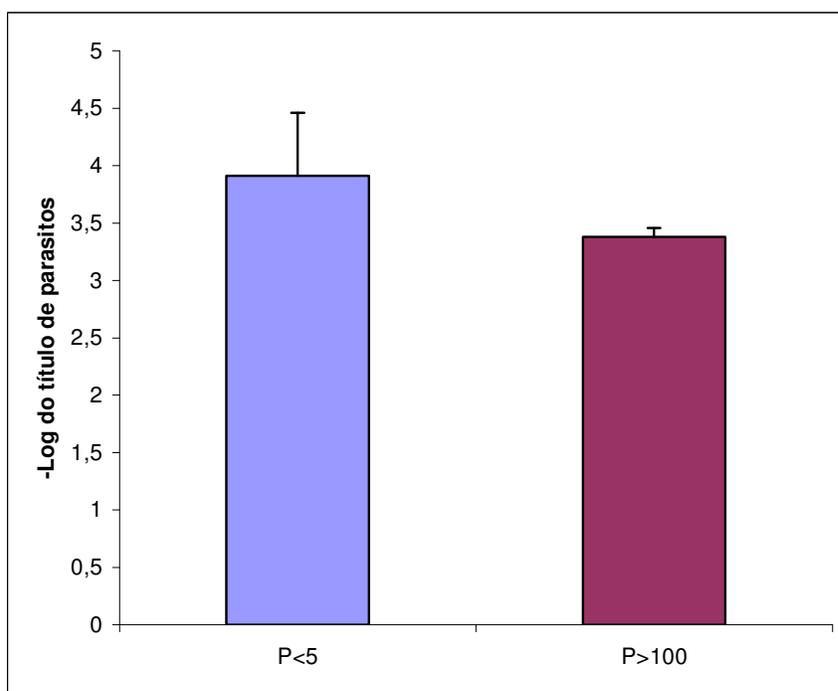


Figura 2 – Parasitismo em lesão de camundongos C57BL/6 após 8 semanas de infecção. Os animais receberam inóculos no coxim plantar da pata posterior esquerda com $1,0 \times 10^7$ parasitos. Os dados representados no gráfico são referentes à média + desvio padrão do -log do título de parasitos obtidos pela combinação de três experimentos independentes, onde foram utilizados 4 animais por grupo.

Os dados obtidos em nosso laboratório confirmam as informações existentes na literatura, visto que a manutenção dos parasitos em cultura por períodos prolongados pode alterar a virulência dos mesmos. Esta alteração foi verificada em cepas de *T. vaginalis* (Meyer-Fernandes, 2002) e em parasitos pertencentes a espécie *L. major* (da Silva & Sacks, 1987) que ao serem mantidas em cultura por aproximadamente cem (100) passagens exibiram virulência diferente da encontrada em protozoários da mesma espécie não mantidos em cultura.

De acordo com as considerações citadas acima e com os resultados que estão representados nas figuras 1 e 2 investigamos se a manutenção dos parasitos de uma mesma cepa em cultura, por períodos diferentes, seria capaz de alterar a capacidade de metabolizar nucleotídeos e a virulência dos mesmos.

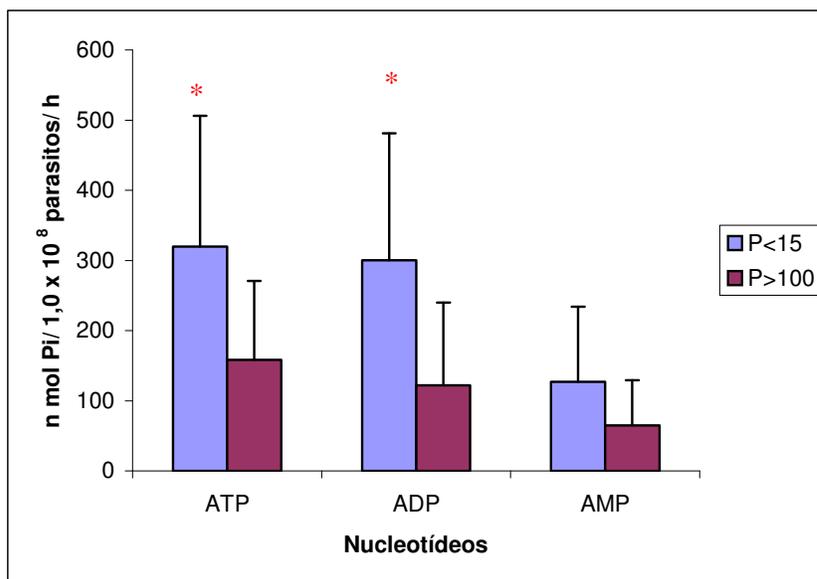


Figura 3-Manutenção de parasitos em cultura por várias passagens altera a capacidade de hidrolisar nucleotídeos. Formas promastigotas de *L. amazonensis* submetidas a poucas (P<15) ou várias passagens (P>100) em cultura foram mantidas em cultura por cinco dias em meio de Grace completo. No 5º dia os parasitos foram utilizados na reação para verificação de metabolismo de nucleotídeos. Os dados representam a média + desvio padrão referente a 10 experimentos independentes reunidos. (*) indica respectivamente diferença estatisticamente significativa para o metabolismo dos nucleotídeos ATP e ADP entre os grupos analisados (p<0,05).

A figura 3 mostra que parasitos da espécie *L. amazonensis* mantidos em cultura por poucas passagens apresentaram maior hidrólise de nucleotídeos quando comparados com os parasitos mantidos em cultura por várias passagens. A diferença para o metabolismo de nucleotídeos foi estatisticamente significativa para os nucleotídeos ATP e ADP. É interessante observar que o parasito mantido em cultura por várias passagens não perde a capacidade de metabolizar os nucleotídeos. O que ocorre é uma redução na atividade metabólica e isso reforça a necessidade de expressão destas enzimas para a sobrevivência dos parasitos em cultura.

De acordo com os resultados obtidos é possível afirmar que parasitos que permanecem em cultura por poucas passagens hidrolisam mais nucleotídeos e são mais virulentos, quando os parasitos são mantidos em cultura por várias passagens ($p > 100$) eles diminuem a capacidade de hidrolisar os nucleotídeos e se tornam menos virulentos.

Dados obtidos na literatura sugerem que a hidrólise de nucleotídeos por parasitos esteja relacionada com a virulência dos mesmos. Os nossos resultados demonstram que os protozoários mantidos em cultura por poucas passagens hidrolisaram mais nucleotídeos extracelulares e causaram lesões maiores nos camundongos C57BL/6, logo é possível que a manutenção dos parasitos pertencentes à espécie *L. amazonensis* em cultura por poucas ou várias passagens altere o metabolismo de nucleotídeos e também a virulência dos mesmos. As informações citadas confirmam os dados obtidos por Berredo-Pinho e cols. (2001) que observaram que em *L. amazonensis* os parasitos com maior atividade ecto-ATPásica foram virulentos enquanto que os com menor atividade ecto-ATPásica foram avirulentas. De acordo com o observado é possível dizer que pode existir uma correlação entre a manutenção dos parasitos em cultura, a hidrólise de nucleotídeos extracelulares e a virulência, pois verificamos que os parasitos mantidos em cultura por várias passagens reduziram a hidrólise de nucleotídeos extracelulares e foram menos infectantes quando inoculados nos camundongos C57BL/6. Os dados obtidos corroboram com o observado por Berredo-Pinho e cols. (2001) que relataram que parasitos pertencentes à espécie *L. amazonensis* quando cultivados “in vitro” por longo período (mais que 600 passagens em cultura) apresentaram redução na atividade de ATPase e foram considerados avirulentos por não serem capazes de estabelecer a infecção no hospedeiro vertebrado. Nossos resultados também demonstram que a

manutenção dos parasitos em cultura por várias passagens altera o metabolismo dos nucleotídeos ATP e ADP.

Os parasitos podem metabolizar os nucleotídeos com a ajuda de enzimas, essa característica permite a utilização de mecanismos de escape que garantem a sobrevivência dos mesmos no organismo dos hospedeiros. É possível que as apirases tenham um papel fundamental para os parasitos, pois podem desativar respostas imunológicas relacionadas com a presença de ATP ou ADP nas superfícies externas das células, como citotoxicidade e reatividade de linfócitos T citolíticos (Fietto e cols.,2004). CD39 (uma NTPDase), presente em células de mamíferos, mostrou um papel modulatório na inflamação e na resposta imune mediada por ATP e ADP extracelulares (Chen & Guidotti, 2001; Mizumoto e cols., 2002).

As enzimas encarregadas do metabolismo de nucleotídeos têm ampla distribuição filogenética e foram identificadas em várias espécies de seres vivos desde vertebrados até bactérias (Handa & Guidotti, 1996; Schulte e cols.,1999).Estas enzimas são fortemente conservadas durante a evolução e devido a isso é possível constatar homologia entre elas, principalmente entre enzimas de helmintos e protozoários parasitos (Gounaris & Selkirk, 2005).

A enzima 5' nucleotidase encontrada em bactérias apresenta ampla especificidade para substratos, pois é capaz de hidrolisar os nucleotídeos ATP, ADP e AMP (Zimmermann, 1992). Por outro lado a enzima 5' nucleotidase de organismos eucariontes são específicas para o metabolismo de AMP e não são capazes de hidrolisar o ATP (Zimmermann, 1996). Dessa forma podemos dizer que no decorrer do processo evolutivo dos seres vivos tais enzimas exerceram papéis fundamentais para sobrevivência e adaptação dos organismos ao meio e simultaneamente elas passaram por modificações que as tornaram específicas para determinados tipos de substratos. A ação da enzima 5' nucleotidase permite a hidrólise do nucleotídeo AMP e torna disponível no meio extracelular a adenosina (Gounaris e cols., 2004). A adenosina é uma molécula necessária a sobrevivência do parasito, porém com ação anti-inflamatória e citoprotetora capaz de inibir citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias geradas pelo organismo do hospedeiro (Synnestvedt e cols, 2002; Spsychala, 2000; Birk e cols., 2002; Le Moine e cols., 1996). De acordo com Haskó & Szabó (1998) a adenosina é um

importante hormônio que é liberado em excesso na proximidade das células do sistema imunológico em situações de stress celular e/ou sistêmico. A geração de adenosina através do metabolismo de nucleotídeos pelos parasitos favorece o estabelecimento da infecção, uma vez que o parasito adquire o nutriente necessário à sobrevivência e simultaneamente disponibiliza no meio extracelular uma determinada quantidade de adenosina capaz de modular a resposta imune do hospedeiro.

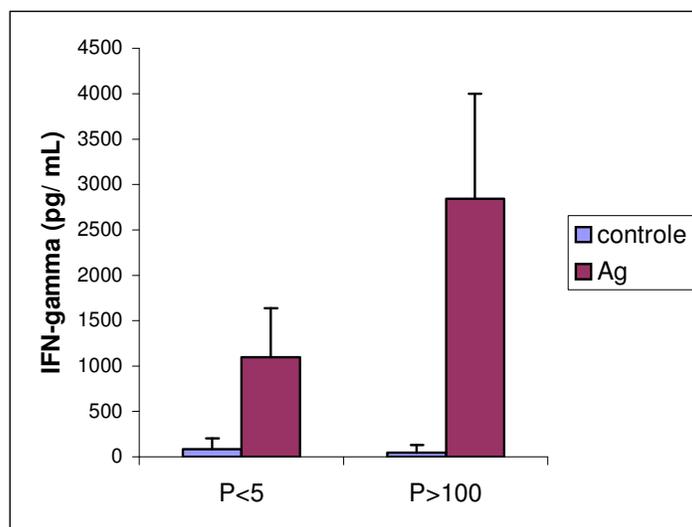
Com o propósito de avaliar as citocinas produzidas pelos animais infectados com os parasitos mantidos em cultura por poucas ou várias passagens, ao final do curso de infecção, foi realizada a dosagem de IFN- γ e IL-4.

Os animais inoculados com parasitos mantidos em culturas por poucas ou várias passagens não sintetizaram IL-4 em níveis detectáveis pela técnica utilizada em nossos experimentos, pois tanto nas culturas de células de linfonodos quanto nas de baços as dosagens ficaram abaixo do limite de detecção (dados não mostrados). Observamos que as células dos linfonodos dos camundongos inoculados com os parasitos submetidos a poucas ou várias passagens em cultura ao serem estimuladas com antígeno de *L. amazonensis*, produziram IFN- γ . Os esplenócitos dos animais inoculados com os parasitos mantidos em cultura por poucas passagens produziram menos IFN- γ e ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados (figura 4).

A menor produção de IFN- γ verificada nas células dos animais infectados com parasitos submetidos a poucas passagens em cultura, poderia favorecer o desenvolvimento de lesões maiores nesses animais do que as verificadas nos camundongos infectados com os parasitos submetidos a várias passagens em cultura.

A produção diferencial de IFN- γ pode estar relacionada com as diferenças na capacidade do parasito hidrolisar os nucleotídeos ATP e ADP. O aumento da concentração de ATP extracelular, causada por danos teciduais, induz a produção de citocinas inflamatórias, como IL-12 e TNF- α (Maioli e cols.,2004; La Sala e cols.,2003). Di Virgilio (2005) relata que a presença de nucleotídeos no meio extracelular devido a danos teciduais ou patógenos pode representar “sinal de perigo” e desencadear a modulação de vários processos biológicos no organismo do hospedeiro.

A) Linfonodos



B) Baços

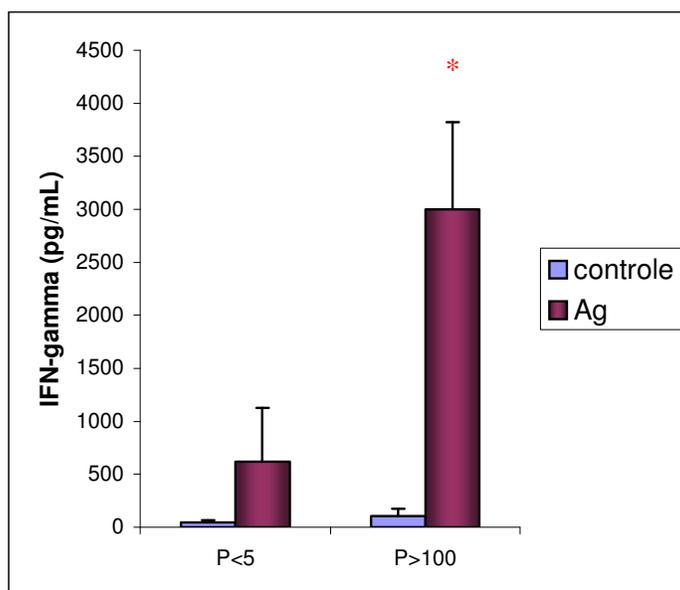


Figura 4 - Produção de IFN- γ por células de linfonodos e esplenócitos de camundongos C57BL/6 após 8 semanas de infecção com *L. amazonensis*. Os dados representados no gráfico se referem a média de concentração + o desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes reunidos, onde foram utilizados 4 animais por grupo. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p<0,05$).

Os nossos resultados sugerem que os parasitos mais virulentos metabolizam mais nucleotídeos, dessa forma retiram do meio extracelular o ATP (molécula com propriedades imunoestimulatórias) e aumentam a concentração extracelular de adenosina, molécula necessária à sobrevivência do parasito e capaz de modular a resposta imunológica. Diante do observado podemos afirmar que esses parasitos conseguem obter os nutrientes indispensáveis a sobrevivência e influenciam negativamente a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro.

O processo de metaciclogênese permite que as formas promastigotas procíclicas de parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* transformem-se em formas promastigotas metacíclicas, que são muito infectantes (Dórea e cols., 2003). Esse processo é necessário para a sobrevivência do parasito, pois a forma promastigota metacíclica é a responsável por causar a infecção no hospedeiro vertebrado. A composição da superfície celular muda durante o ciclo de vida dos parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* (Naderer e cols., 2004). Meyer-Fernandes e cols. (1997) demonstraram que formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania donovani* e promastigotas de *Leishmania mexicana mexicana* apresentaram na superfície externa da membrana celular enzimas responsáveis pelo metabolismo de nucleotídeos extracelulares.

Pinheiro e cols. (2006) analisaram a modulação da atividade de ecto-NTPDase existentes na superfície de *L. amazonensis* durante o crescimento “*in vitro*” e verificaram que ocorre uma acentuada redução dos níveis de atividade da enzima e também há diminuição da expressão dos níveis de enzima na superfície das células quando os parasitos permanecem por mais tempo em cultura. O estudo realizado com o protozoário *Trypanosoma cruzi* revelou que o parasito apresenta uma ecto-ATPase em sua superfície externa e que em seus estágios infectantes (tripomastigotas e amastigotas) foram observados maior atividade metabólica do que nos epimastigotas não infectantes. O que sugere que a atividade dessa enzima pode ser considerada um marcador de virulência para os parasitos citados (Meyer-Fernandes e cols., 2004).

Inicialmente, com o objetivo de verificar se o tempo de manutenção dos parasitos em cultura poderia alterar o processo de metacicloênese e conseqüentemente o curso da infecção, foi feita a avaliação da porcentagem de formas metacíclicas encontradas nas culturas. Para verificarmos esta questão, parasitos mantidos em cultura por poucas e por várias passagens foram mantidos em cultura por cinco dias. No quinto dia foi realizada a separação das formas promastigotas metacíclicas existentes em cada cultura e em seguida a contagem. Os dados (figura 5) representados mostram que parasitos mantidos por poucas passagens em cultura apresentaram maior porcentagem de formas promastigotas metacíclicas em cultura do que os parasitos mantidos em cultura por várias passagens. Esse dado confirma o observado nos experimentos anteriores, onde camundongos infectados com os parasitos mantidos em cultura por poucas passagens apresentaram maiores lesões no decorrer do curso de infecção e essa característica pode estar relacionada com a maior porcentagem de formas infectantes existentes nas culturas.

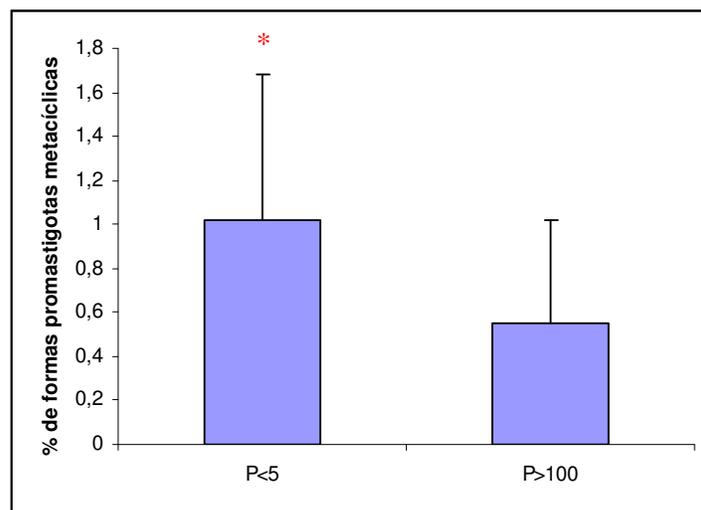


Figura 5 - Manutenção de parasitos em cultura altera a porcentagem de formas metacíclicas. O gráfico representa a média + desvio padrão de 14 experimentos independentes para avaliação da porcentagem de formas metacíclicas encontradas em cada uma das culturas. (*) indica diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$).

A observação de que existe diferença na porcentagem de formas metacíclicas nas culturas e as informações encontradas na literatura fizeram com que questionássemos se a capacidade de hidrólise dos nucleotídeos destas formas também seria alterada à medida que os parasitos fossem mantidos em cultura. Inicialmente foi feita a comparação entre as formas promastigotas e as formas promastigotas metacíclicas dos parasitos mantidos em cultura por poucas passagens. Para verificação dessa questão os parasitos foram mantidos em cultura por um período de cinco dias. No quinto dia as formas promastigotas e as metacíclicas foram utilizadas para a avaliação da capacidade de metabolizar os nucleotídeos. A figura 6A traz a representação dos dados obtidos. É possível verificar que as formas promastigotas metacíclicas metabolizaram mais nucleotídeos do que as procíclicas e há diferença estatisticamente significativa relacionada ao metabolismo do ATP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

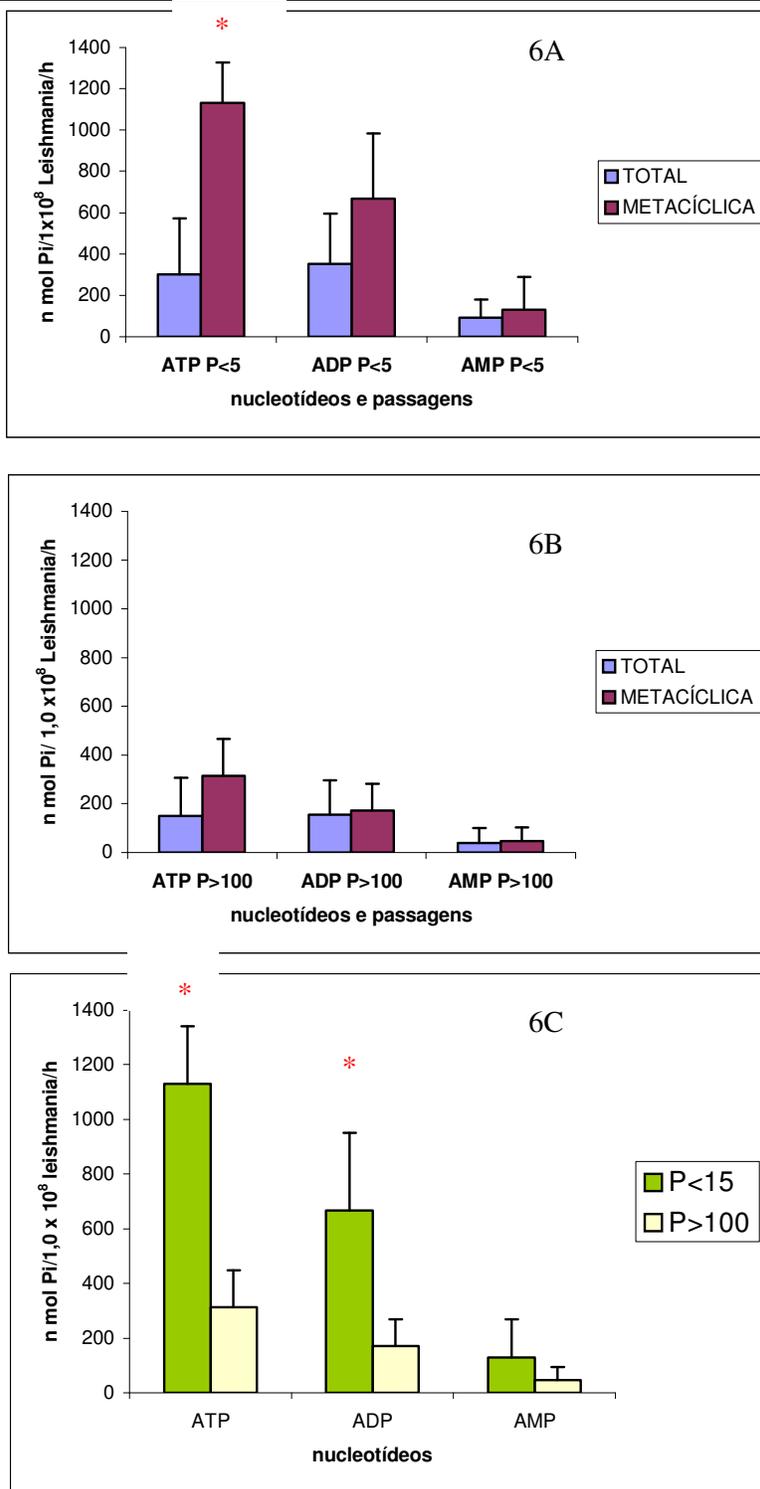


Figura 6- Metaciclógenese e o metabolismo de nucleotídeos. Comparação da atividade ecto-nucleotídica entre formas promastigotas total e promastigotas metacíclicas mantidas em cultura por poucas (A) ou várias passagens (B). Em C foi feita a comparação entre a atividade ecto-nucleotídica das formas promastigotas metacíclicas mantidas em cultura por poucas ou várias passagens. Os dados representam a média + desvio padrão de 4 experimentos independentes reunidos. (*) indica diferença estatisticamente significativa para o metabolismo dos nucleotídeos ($p < 0,05$).

De acordo com a figura 6B não é observada diferença estatisticamente significativa entre a hidrólise de nucleotídeos por formas promastigotas totais e promastigotas metacíclicas mantidas em cultura por várias passagens.

Os dados obtidos demonstram que além da diferença na porcentagem de formas promastigotas metacíclicas nas culturas existe diferença relacionada ao metabolismo de nucleotídeos à medida que os parasitos são mantidos por um período maior ou menor em cultura. Essa informação foi confirmada quando fizemos avaliação do metabolismo dos nucleotídeos realizado pelas formas promastigotas metacíclicas dos parasitos em passagens diferentes. A figura 6C nos mostra que as formas promastigotas metacíclicas dos parasitos mantidos em cultura por poucas passagens hidrolisaram mais nucleotídeos do que as formas promastigotas metacíclicas mantidas em cultura por várias passagens. Foram observadas diferenças significativas para o metabolismo de ATP e ADP entre as passagens analisadas. Sabemos que existem enzimas especializadas no metabolismo de nucleotídeos e sugerimos que a maior expressão dessas enzimas em formas metacíclicas de parasitos, mantidos em cultura por poucas passagens, esteja relacionada à necessidade de aquisição de nutrientes e simultaneamente envolvida no estabelecimento do parasito no organismo do hospedeiro vertebrado.

O período de manutenção dos parasitos em cultura é um fator relevante, pois já foi verificado (da Silva & Sacks, 1987) e nossos dados confirmam que a manutenção dos parasitos em cultura por várias passagens reduz a porcentagem de formas metacíclicas existentes nas culturas. Nossos dados demonstram que os parasitos mantidos em cultura por várias passagens apresentam redução no metabolismo de nucleotídeos, possivelmente devido a alteração na expressão das ectonucleotidasas. A constatação dos resultados e a informação de que as ecto-ATPases podem atuar como possíveis marcadores de virulência (Radvin & Guarrant, 1981; Barros e cols., 2000) indicam a existência de uma correlação entre a expressão de ectonucleotidasas e a virulência em *L. amazonensis*.

Maioli e cols.(2004) ao compararem o curso da infecção causada por formas metacíclicas de *L. amazonensis* com a infecção causada por formas metacíclicas de *L. braziliensis* nos camundongos C57BL/6 verificaram que os camundongos responderam de forma diferente à infecção causada pelos parasitos citados. Os camundongos inoculados com *L. amazonensis* não controlaram a infecção e desenvolveram lesões que aumentaram continuamente de tamanho ao longo do curso de infecção, o que não foi observado nos camundongos inoculados com *L. braziliensis*, estes apresentaram cura espontânea das lesões.

Constatamos que formas promastigotas metacíclicas hidrolisaram mais nucleotídeos e que existe diferença significativa relacionada ao metabolismo de nucleotídeos ao compararmos as formas metacíclicas dos parasitos mantidos em cultura por poucas ou várias passagens. O observado fez com que investigássemos a infecção causada pelas formas metacíclicas dos parasitos.

O gráfico da figura 7 mostra que os camundongos que receberam o inóculo com as formas promastigotas metacíclicas mantidas em cultura por poucas passagens desenvolveram lesões maiores quando comparados com os animais do grupo inoculado com as formas promastigotas metacíclicas mantidas em cultura por várias passagens. As lesões foram progressivas para ambos os grupos, porém maiores para os animais que receberam inóculo contendo os parasitos mantidos em cultura por poucas passagens. Foi verificada diferença estatisticamente significativa a partir da sétima semana.

A quantificação dos parasitos mostra que os camundongos inoculados com os parasitos mantidos em cultura por poucas passagens apresentaram maior carga parasitária no sítio de infecção quando comparado com os camundongos do outro grupo (figura 8). A análise estatística permitiu a verificação de diferença significativa entre os resultados obtidos.

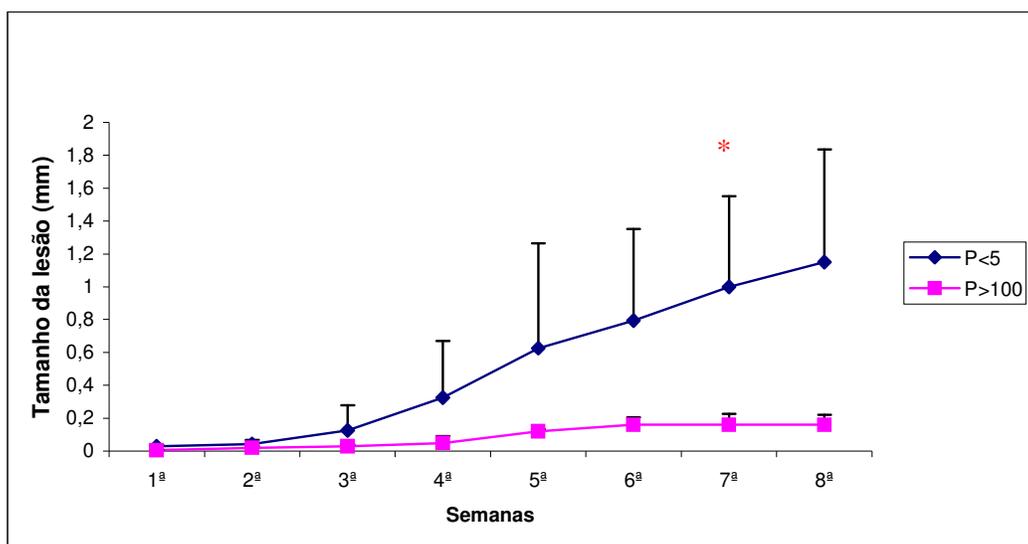


Figura 7 – Curva de desenvolvimento de lesão em camundongos C57BL/6 inoculados com formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* mantidas em cultura por poucas ou várias passagens. Os animais receberam inóculo contendo $1,0 \times 10^5$ parasitos no coxim plantar da pata posterior esquerda. O gráfico representa a média + desvio padrão dos valores obtidos para as lesões em 3 experimentos independentes reunidos. Em cada experimento foram utilizados 4 animais por grupo. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$) a partir deste tempo.

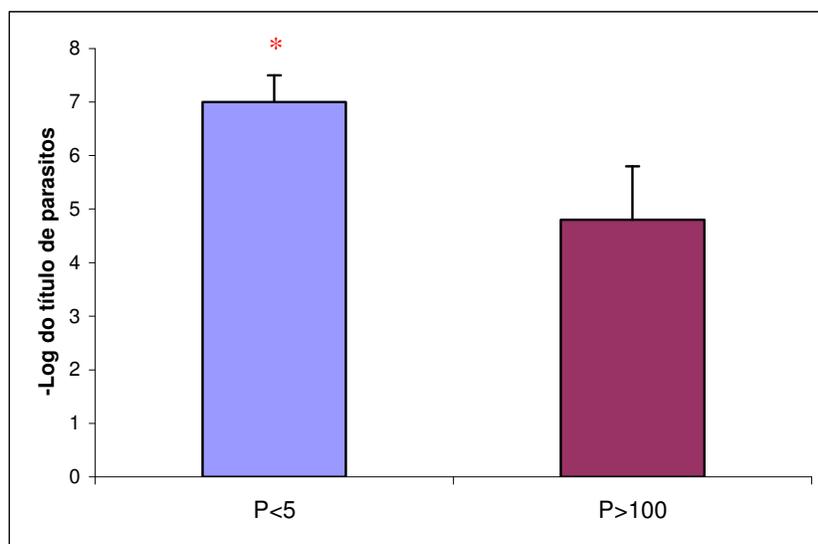


Figura 8 - Parasitismo em lesão de camundongos C57BL/6 que receberam inóculo contendo formas promastigotas metacíclicas de passagens diferentes, no coxim plantar da pata posterior esquerda. Os dados representados no gráfico são referentes à média + desvio padrão de $-\log$ do título de parasitos obtidos pela combinação de três experimentos independentes, onde foram utilizados 4 animais por grupo. Foi observada diferença significativa entre os grupos representada por * ($p < 0,05$).

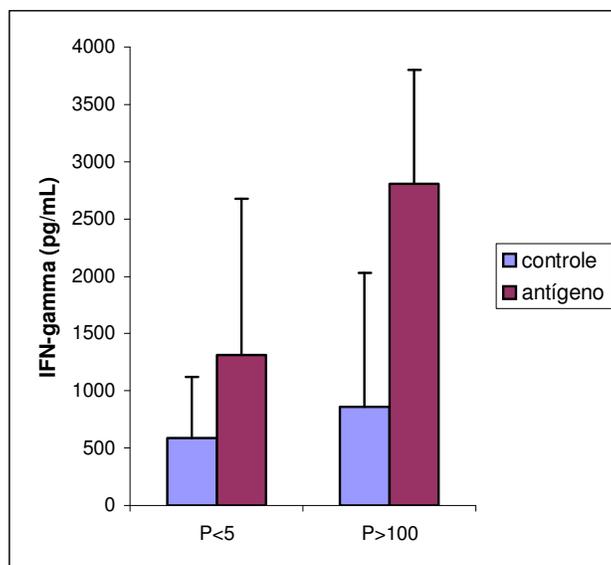
Os resultados obtidos mostram que o tempo de permanência dos parasitos em cultura altera a virulência das formas promastigotas metacíclicas e altera o curso de infecção nos hospedeiros vertebrados. Nossos dados também confirmam o desenvolvimento de lesões progressivas nos camundongos C57BL/6 infectados por *L. amazonensis* como demonstrado por Maioli e cols. (2004). Podemos notar que os camundongos pertencentes as linhagens C57BL/10 e C57BL/6, resistentes a infecção causada por *L. major*, quando são infectados com a espécie *L. amazonensis* não conseguem controlar a infecção (Afonso & Scott, 1993; Maioli e cols., 2004). As informações sugerem a existência de fatores relacionados a virulência dos parasitos que variam de acordo com as espécies e são capazes de modular o desenvolvimento da infecção.

A avaliação do perfil de citocinas demonstrou que camundongos C57BL/6 inoculados com formas promastigotas metacíclicas mantidas em cultura por poucas ou várias passagens não foram capazes de produzir IL-4 (dados não mostrados).

Os dados representados na figura 9 demonstram que camundongos inoculados com formas promastigotas metacíclicas dos parasitos mantidos em cultura por poucas ou várias passagens produziram IFN- γ e que as informações são válidas tanto para as células dos linfonodos quanto para os esplenócitos.

Ji e cols.(2003) afirmam que, durante o curso da infecção com *L. amazonensis* camundongos C57BL/6 e BALB/c não apresentam uma resposta Th2 vigorosa e que a deleção de genes para IL-4 e IL-10 em camundongos infectados com o parasito citado não causa alteração no desenvolvimento da lesão e na carga parasitária, enquanto a deleção de genes envolvidos no desenvolvimento de imunidade mediada por célula e anticorpos aumentou significativamente a susceptibilidade (Kima e cols.,2000).

A) Linfonodos



B) Baços

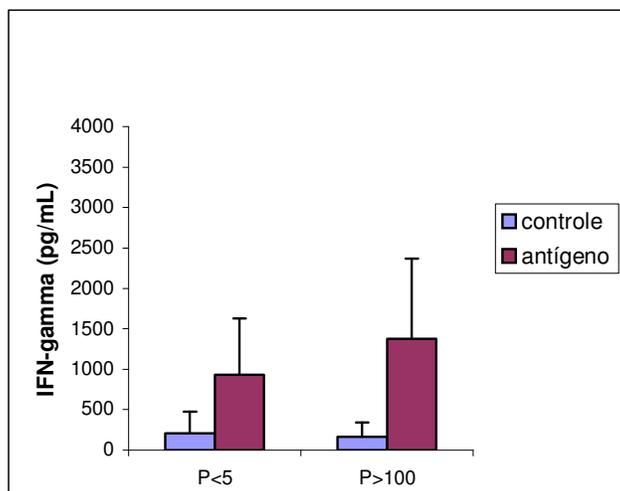


Figura 9 - Formas metacíclicas de *L. amazonensis* modulam a produção de citocinas nos camundongos C57BL/6. A verificação da produção de IFN- γ por células de linfonodos e esplenócitos de camundongos foi realizada 8 semanas após o inóculo dos parasitos. Os dados representados no gráfico se referem à média de concentração + o desvio padrão obtido em 3 experimentos independentes, onde foram utilizados 4 animais por grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Com o objetivo de verificar se a passagem do parasito pelo hospedeiro causaria alteração na atividade ecto-nucleotídásica de *L. amazonensis*, decidimos avaliar a hidrólise de nucleotídeos provocada pelas formas promastigotas metacíclicas do parasito mantido em cultura por várias passagens submetidas à pressão imunológica dos camundongos. Para isso, tais parasitos, foram inoculados nos camundongos C57BL/6 e reisolados de lesões de patas após 8 semanas de infecção. Os parasitos reisolados foram utilizados na realização de ensaio de atividade ectonucleotídásica em comparação com formas metacíclicas mantidas em cultura por poucas passagens. A figura 10 traz a representação gráfica dos resultados obtidos e é possível verificar que os parasitos mantidos em cultura por várias passagens e reisolados após o contato com o hospedeiro não recuperaram o metabolismo dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP citados. Nota-se que para todos os nucleotídeos observados os parasitos mantidos em cultura por poucas passagens apresentaram maior hidrólise de nucleotídeos do que os reisolados e a diferença observada foi estatisticamente significativa. É interessante citar que os parasitos reisolados mantiveram a hidrólise de nucleotídeos próxima da observada nos parasitos antes de serem inoculados (figuras 6B e 6C).

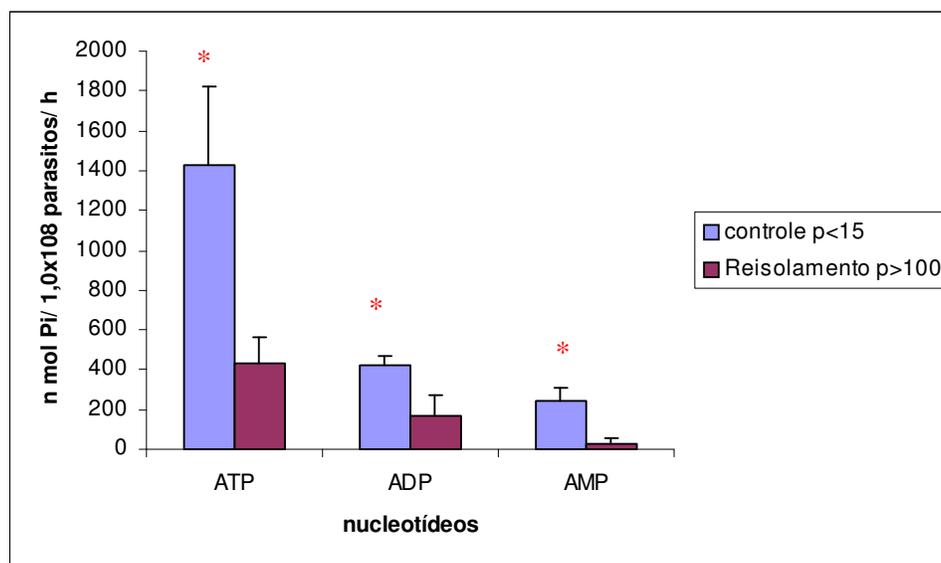


Figura 10- Manutenção dos parasitos em cultura e a hidrólise de nucleotídeos. Parasitos mantidos em cultura por várias passagens não recuperam a capacidade de hidrólise de nucleotídeos após 1 passagem em camundongos C57BL/6. Após 5 dias de cultura foi feita a separação das formas metacíclicas pelo gradiente de Ficoll em culturas controle (com parasitos mantidos por poucas passagens em cultura) e nas culturas do reisolamento para verificar a atividade ecto-nucleotídásica dos parasitos. Os dados representam a média + desvio padrão referente a 3 experimentos independentes para avaliar a hidrólise extracelular de cada nucleotídeo por formas promastigotas metacíclicas de parasitos. Foi observada diferença estatisticamente significativa para os nucleotídeos ATP, ADP e AMP. (*) indica diferença significativa entre a hidrólise de cada nucleotídeo pelos parasitos ($p < 0,05$)

Os dados sugerem que a manutenção dos parasitos em cultura altera a capacidade de hidrólise de nucleotídeos como demonstrado por Berredo-Pinho e cols.(2001) e por dados obtidos em nosso laboratório que afirmam que uma cepa de *L. major* com menor atividade ecto-atpásica perdeu a capacidade de causar infecção nos camundongos C57BL/6 (dados não publicados). É possível que a manutenção dos parasitos por períodos prolongados em cultura promova a seleção de organismos com menor hidrólise de nucleotídeos extracelulares e conseqüentemente menos virulentos. No decorrer do processo evolutivo dos seres vivos é possível verificar que tais enzimas exerceram papéis fundamentais para que os organismos pudessem sobreviver e adaptar-se as condições oferecidas pelo ambiente uma vez que em *Toxoplasma gondii* foi verificado que não existe diferença entre a atividade de ATPase de cepas virulentas e avirulentas, mas a atividade destas enzimas foi conservada em níveis significativos que garantiram a sobrevivência dos parasitos no meio intracelular (Asai & Suzuki, 1990) e em alguns casos a diferença na atividade ectonucleotidásica serviu como fator determinante para a diferenciação fisiológica e taxonômica de algumas espécies, o que é demonstrado através da comparação da atividade ecto-ATPásica de amebas de vida livre, a forma não invasiva de *Entamoeba histolytica* e a forma patogênica do parasito (Barros e cols., 2000).

De acordo com as informações é preciso que outros experimentos sejam realizados para avaliar se a redução da virulência em *L. amazonensis* será algo permanente ou se a exposição a outros sistemas biológicos poderá favorecer a reativação da infecciosidade. Experimentos com outros hospedeiros vertebrados precisam ser realizados para avaliar se o comportamento do parasito pode ser alterado devido às características genéticas dos hospedeiros infectados, pois há relato de que uma cepa de *L. major* foi capaz de recuperar sua virulência após passagem em camundongo BALB/c (da Silva & Sacks, 1987).

Os dados mostram que *L. amazonensis* pode metabolizar os nucleotídeos ATP, ADP e AMP presentes no meio extracelular e informações obtidas na literatura relatam que a presença de adenosina em cultura possibilita o aumento no crescimento do parasito e diminui a atividade ecto-ATPásica dos mesmos (Berrêdo-Pinho e cols., 2001). Diante destas considerações investigamos a influência do tratamento com

adenosina em parasitos mantidos em cultura por poucas passagens e no curso da infecção causada por esses parasitos.

Para observar a influência do tratamento com adenosina, em parasitos mantidos em cultura por poucas passagens, foram utilizadas culturas tratadas com 5mM de adenosina e culturas que não receberam o tratamento (culturas controle). É importante lembrar que os parasitos de ambas as culturas estavam sempre na mesma passagem e que o tratamento das culturas foi feito no primeiro dia. No quinto dia após a preparação da cultura, foi feita a separação das formas metacíclicas pelo gradiente de Ficoll para serem utilizadas na avaliação da atividade ecto-nucleotídásica (figura 11) e para o inóculo dos camundongos.

Os resultados (figura 11) mostram que ocorreu uma diminuição na hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP pelos parasitos que receberam o tratamento. Nota-se que ocorreu diferença significativa relacionada ao metabolismo do nucleotídeo ATP. Dessa forma confirmamos o observado por Berredo-Pinho e cols.(2001) que relatam que parasitos crescidos em meio suplementado com adenosina apresentam decréscimo na atividade ecto-ATPásica dependente de Mg.

Verificamos que os parasitos tratados com adenosina também metabolizam AMP extracelular, o que sugere que o tratamento não foi capaz de inibir a expressão da enzima 5' nucleotidase, é possível que o parasito tenha reduzido a expressão desta enzima temporariamente devido a disponibilidade de adenosina no meio de cultura. Esse dado é relevante, pois complementa o verificado por Berredo-Pinho e cols. (2001) e confirma a influência do meio extracelular no comportamento do parasito.

O tratamento de *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas passagens com adenosina fez com que percebêssemos maior número de parasitos nas culturas tratadas (dados não mostrados) o que está de acordo com o verificado por Berredo-Pinho e cols.(2001) e com a função protetora que a adenosina exerce nas células dos protozoários o que favorece o processo de divisão celular (Gounaris e cols.,2004).

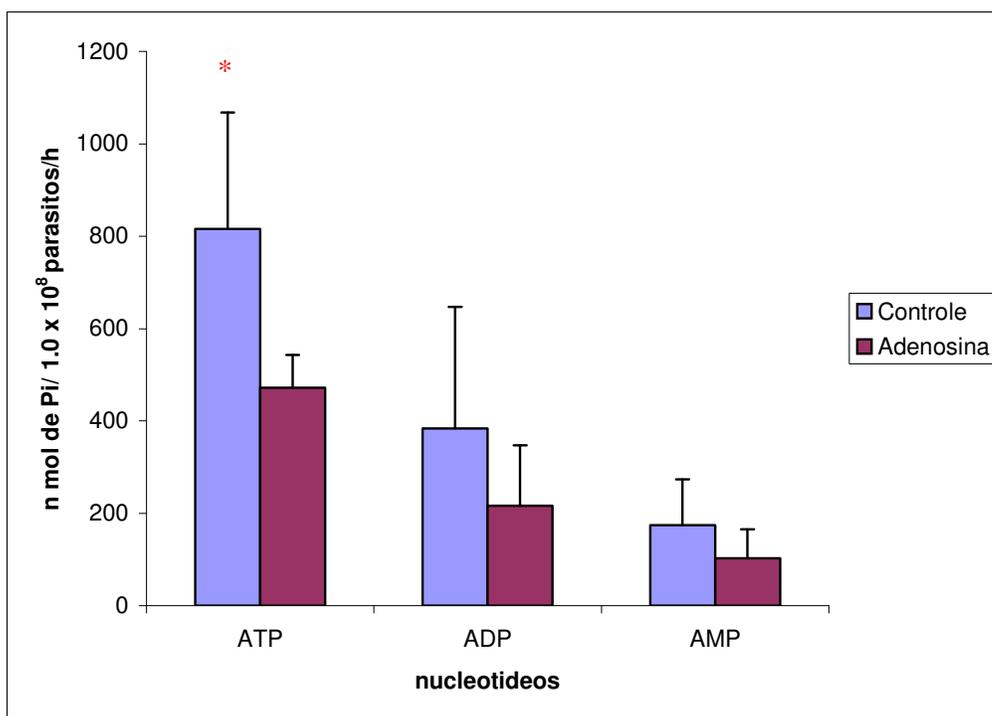


Figura 11-Tratamento com adenosina influencia o metabolismo de nucleotídeos. Os parasitos mantidos em cultura por poucas passagens utilizados para avaliação da atividade ectonucleotídásica permaneceram em meio de Grace completo suplementado ou não com adenosina (5mM) por um período de 5 dias. Os dados são provenientes de 5 experimentos independentes e representam a média + desvio padrão referente ao metabolismo de cada nucleotídeo pelos parasitos. Ocorreu diferença estatisticamente significativa para o metabolismo de ATP (* p<0,05).

Para avaliar o curso de infecção pelos parasitos tratados com adenosina os camundongos C57BL/6 foram inoculados no coxim plantar da pata posterior esquerda com $1,0 \times 10^5$ formas promastigotas metacíclicas dos parasitos. O curso da infecção foi observado até a sétima semana e foi possível montar uma curva que demonstra o tamanho da lesão encontrada nos camundongos durante o período citado (figura 12). As lesões observadas nos camundongos inoculados com os parasitos tratados com adenosina foram menores do que as desenvolvidas nos animais do grupo que recebeu o inóculo contendo os parasitos não tratados. Verificamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos a partir da sexta semana após o inóculo dos parasitos.

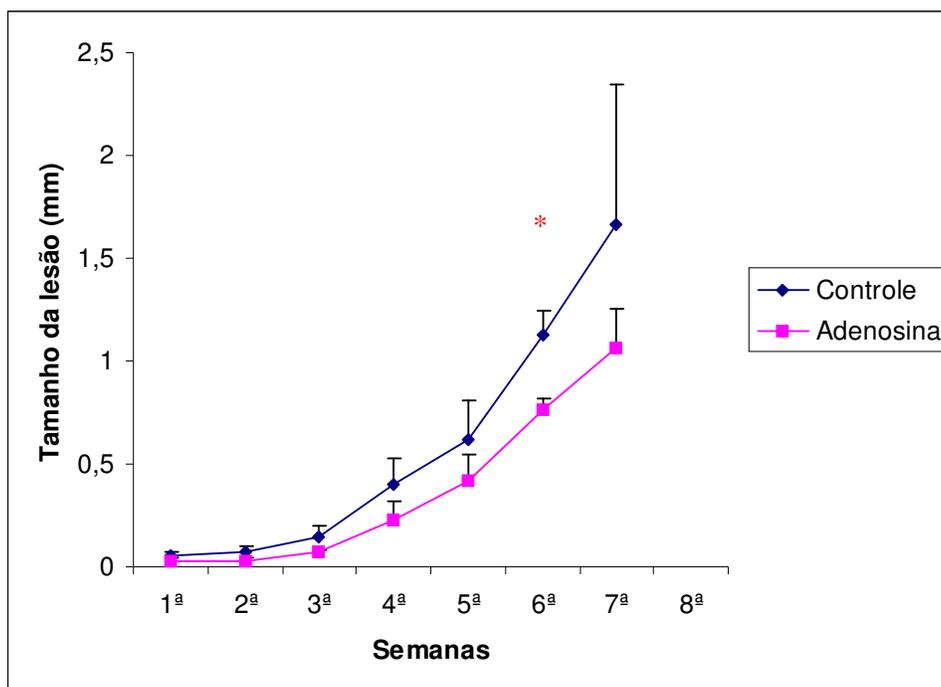


Figura 12 – Tratamento com adenosina e o desenvolvimento de lesão. Curva de desenvolvimento de lesão em camundongos C57BL/6 inoculados com formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* mantidas em cultura por poucas passagens tratadas ou não com adenosina. Os animais foram inoculados no coxim plantar da pata posterior esquerda. O gráfico representa a média + desvio padrão dos valores obtidos para as lesões em 3 experimentos independentes. Em cada experimento foram utilizados 5 animais por grupo. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$) a partir do referido tempo.

A verificação da quantidade de parasitos no sítio de infecção é relevante e torna-se fundamental para compreensão do que acontece ao final do curso da infecção. Observa-se que os animais do grupo controle ao final de oito semanas não apresentaram carga parasitária maior do que os animais pertencentes ao grupo que recebeu o inóculo tratado com adenosina 5mM.

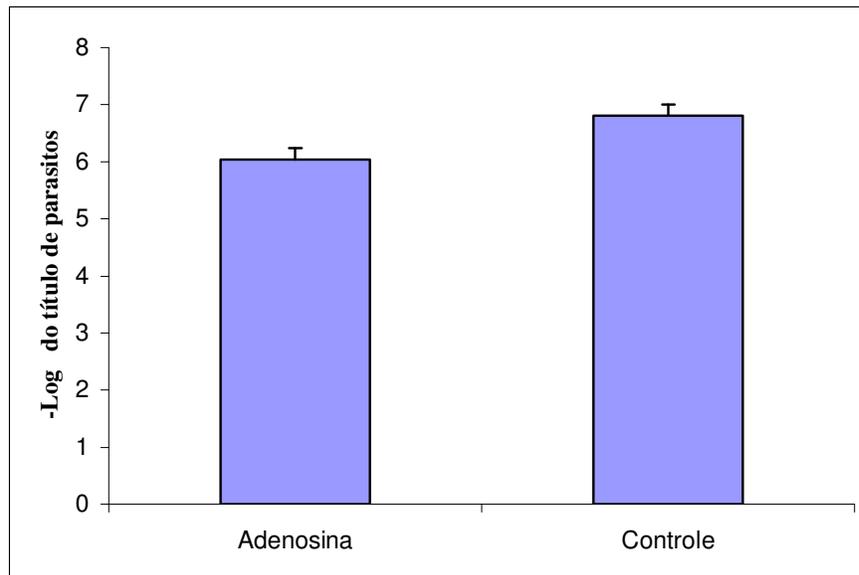


Figura 13-Tratamento com adenosina e o parasitismo em lesão de pata de camundongos C57BL/6. Ao final de oito semanas de infecção foi realizada a quantificação dos parasitos do local infectado. Os dados representados no gráfico são referentes à média + desvio padrão de -log do título de parasitos obtidos pela combinação de três experimentos independentes em que foram utilizados 5 animais por grupo.

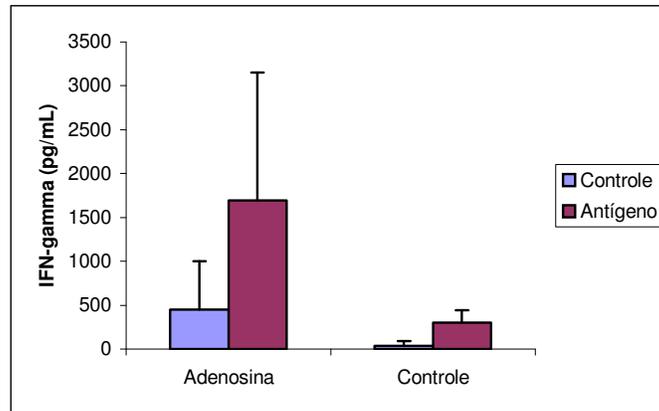
Os resultados indicam que o tratamento com adenosina reduz a atividade ectonucleotidásica e a virulência do parasito, o que sugere, mais uma vez, a existência de uma correlação entre a virulência e a capacidade de hidrolisar nucleotídeos em *L. amazonensis*.

A avaliação da produção de IFN- γ mostra que os animais de ambos os grupos foram capazes de sintetizar esta citocina. Isso foi verificado para as células de linfonodos e para os esplenócitos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos.

Os dados apresentados na figura 14 sugerem que o metabolismo de nucleotídeos pode influenciar a resposta imunológica do hospedeiro. Os parasitos tratados, em cultura, com adenosina tiveram redução na atividade ecto-nucleotidásica e foram menos virulentos. É possível que o tratamento com adenosina no momento do preparo da cultura tenha influenciado o metabolismo de nucleotídeos dos parasitos. Sugerimos que o tratamento tenha induzido a redução na expressão de enzimas envolvidas no metabolismo seqüencial de nucleotídeos nas formas promastigotas metacíclicas dos parasitos, estes ao serem inoculados hidrolisaram ATP em pequena quantidade o que favoreceu o estabelecimento da resposta imune inflamatória nos camundongos C57BL/6. Torna-se necessário avaliar se este tratamento pode alterar a hidrólise dos nucleotídeos apenas nas formas promastigotas metacíclicas do parasito ou se essa alteração é verificada também nas formas amastigotas.

O metabolismo dos nucleotídeos extracelulares é influenciado pelo tipo de citocina que é encontrado no meio extracelular. Sabe-se que em monócitos IFN- γ e IL-4 reduz a atividade de 5' ecto-nucleotidase (Armstrong e cols., 1988, Christensen e cols. 1992, Hunsucker e cols., 2005) enquanto as citocinas IL-1 β e TNF α em células de ratos induzem a atividade da enzima 5' ecto-nucleotidase (Savic e cols. 1990, Hunsucker e cols, 2005). As informações obtidas reforçam a necessidade de investigar o perfil da resposta imunológica desenvolvida pelos hospedeiros vertebrados inoculados com os parasitos tratados ou não em cultura com adenosina 5mM, visto que tal molécula atua como modulador endógeno e apresenta propriedades anti-inflamatória e imunossupressora (Majumdar & Aggarwall, 2003). É preciso verificar se o metabolismo de nucleotídeos extracelulares pelo organismo do hospedeiro associado ao dos parasitos pode favorecer o desenvolvimento de lesões nos hospedeiros vertebrados, pois como citado a presença de adenosina no meio extracelular modula o sistema imunológico do hospedeiro vertebrado e é capaz de influenciar o comportamento dos parasitos.

A) Linfonodos



B) Baços

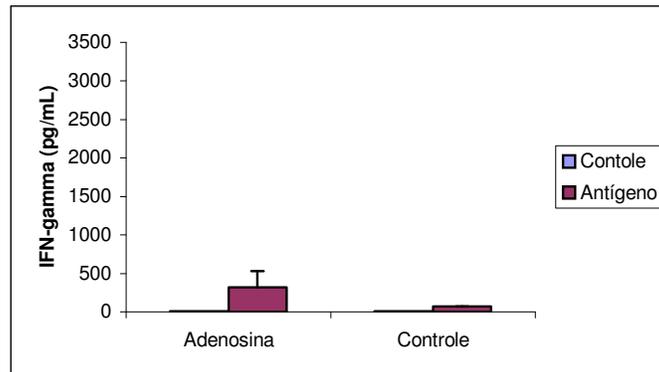


Figura 14- Tratamento com adenosina em cultura x produção de IFN- γ por células de linfonodos e esplenócitos de camundongos C57BL/6 após 8 semanas de infecção com *L. amazonensis*. Os dados representados no gráfico se referem à média da concentração + o desvio padrão obtidos a partir de 2 experimentos independentes, onde foram utilizados 5 animais por grupo.

A sobrevivência dos parasitos no organismo do hospedeiro está associada aos fatores de virulência expressados pelos parasitos e a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro vertebrado. Sabe-se que a molécula de lipofosfoglicano (LPG) é um dos principais fatores associados a sobrevivência e infecciosidade de parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* (Desconteaux & Turco, 1999; Naderer e cols., 2004) e atualmente é destacada a presença das enzimas responsáveis pelo metabolismo dos nucleotídeos extracelulares presentes na superfície celular dos tripanosomatídeos e a relação com a virulência dos parasitos (Berredo-Pinho e cols., 2001).

Os nucleotídeos extracelulares são moléculas purinérgicas sinalizadoras com diversas funções fisiológicas em numerosos sistemas biológicos (Ralevic & Burnstock, 1998). A sinalização purinérgica envolve a interação de nucleotídeos ou seus produtos de degradação com receptores purinérgicos de membrana que são capazes de participar dos processos de transdução de sinais para o meio intracelular (Zimmermann, 2000).

A presença de apirases na saliva de artrópodos hematófagos (Ribeiro, 1987, 1995) e a verificação da atividade destas enzimas também na saliva de insetos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Ribeiro e cols., 1989), bem como em insetos pertencentes a espécie *Lutzomyia longipalpis* sugerem que a atividade destas enzimas é fundamental para que os insetos possam adquirir os nutrientes necessários a sobrevivência durante o repasto sanguíneo, uma vez que a geração de adenosina pode conferir uma vantagem seletiva para o inseto, devido ao efeito vasodilatador dessa substância (Biaggioni, 2004).

De acordo com o observado verificamos que as ecto-nucleotidases influenciam todas as etapas do ciclo biológico dos parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania*. Elas podem disponibilizar substâncias importantes para a sobrevivência do parasito e do hospedeiro invertebrado devido a geração de adenosina e conseqüentemente modular a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro vertebrado. Mbow e cols. (1998) em experimentos realizados com *L. major* e camundongos fêmeas CBA/CaH-T6J demonstraram que o inóculo do parasito associado ao lisado de glândula salivar de *Phlebotomus papatasi* causou exacerbação da infecção, esta observação mostra a importância das ecto-nucleotidases presentes na saliva do inseto nas fases iniciais da

infecção e confirma que a ação das ecto-nucleotidases da saliva do inseto em associação com as ecto-nucleotidases dos parasitos potencializam a infecção causada por parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania*. Tal observação é relevante, pois na natureza durante o repasto sanguíneo o inseto transmissor inocula os parasitos junto com a saliva. Ribeiro e cols. (2000) relatam que na saliva de insetos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* a presença da enzima 5' nucleotidase confere uma vantagem ao converter AMP para adenosina, uma substância com potente ação vasodilatadora e anti-plaquetária, diante desta observação pode-se dizer que o comportamento do inseto associado a atividade ectonucleotidásica favorece a aquisição de nutrientes e em conjunto com a atividade das enzimas situadas na membrana celular dos parasitos modula a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro vertebrado.

A presença de nucleotídeos no meio extracelular modula a função desempenhada pelas células dendríticas (Schnurr e cols., 2000). A presença de ATP no meio extracelular em sinergia com TNF- α induz a maturação de monócitos e particularmente a produção de IL-12 (Schnurr e cols., 2000) o que permite o desenvolvimento de uma resposta protetora e o possível controle da infecção causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. Devido a esta observação torna-se necessário o estudo e a compreensão da relação existente entre o metabolismo de nucleotídeos e a resposta imune nos diversos casos de infecção causados por protozoários, uma vez que é confirmada a presença de enzimas especializadas no metabolismo de nucleotídeos extracelulares em tripanosomatídeos.

De acordo com os resultados obtidos a investigação dos fatores relacionados à virulência dos parasitos é algo importante para compreendermos os mecanismos relacionados com a interação parasito-hospedeiro e ao mesmo tempo poderá permitir o desenvolvimento de fármacos que poderão ser utilizados no tratamento das leishmanioses.

CONCLUSÃO

“Mire e veja: o importante e bonito, do mundo, é isto: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas...”

(Guimarães Rosa).

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que existe correlação entre o tempo de manutenção em cultura, virulência e a atividade ecto-nucleotidásica em *L. amazonensis* e é possível ressaltar que:

- Os parasitos mantidos em cultura por poucas passagens apresentaram maior porcentagem de formas promastigotas metacíclicas, hidrolisaram mais nucleotídeos e causaram lesões maiores nos camundongos C57BL/6.
- O tratamento com adenosina foi capaz de alterar o metabolismo de nucleotídeos e o curso da infecção causada pelos parasitos mantidos em cultura por poucas passagens.
- A manutenção dos parasitos em cultura por várias passagens pode selecionar aqueles que apresentam atividade ecto-nucleotidásica reduzida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO L.C.C. & SCOTT P. (1993) Imune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.* **61**, 2952-2959.
- AGUILAR TORRENTERA F., LAMAN J. D., MEURS M. V., ADORINI L., MURALE E. & CARLIER Y (2002) Endogenous interleukin 12 is critical for controlling the late but not the early stage of *Leishmania mexicana* infection in C57BL/6 mice. *Infection and Immunity* **70**, 5075-5080.
- ALEXANDER J. & BRYSON K. (2005) T helper (h) 1/ Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunology Letters* **99**, 17-23.
- ALEXANDER J., SATOSKAR A. R. & RUSSELL D. G. (1999) *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science* **112**, 2993-3002.
- ALEXANDER J. & RUSSELL D. G. (1992) The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Advan. Parasitol.* **31**, 175-254.
- ASAI T. & SUZUKI Y. (1990) Remarkable activities of nucleoside triphosphate hydrolase in tachyzoites of both virulent and avirulent strains *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**, 89-92.
- ASHFORD R. W. (2000) The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* **30**, 1269-1281.
- ARMSTRONG M. A., SHAH S., HAWKINS S. A., BELL A. L. & ROBERTS D. S. (1988) Reduction of monocyte 5' nucleotidase activity by gamma-interferon in multiples sclerosis and autoimmune diseases. *Ann. Neurol* **24**, 12-16.
- BARRAL A., PEDRAL-SAMPAIO D., GRIMALDI JUNIOR G., MOMEN H., McMAHON -PRATT D., RIBEIRO DE JESUS A., ALMEIDA R., BADARO R., BARRAL-NETTO M., CARVALHO E. M. (1991) Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **44**, 536-546.
- BARRAL-NETTO M., VON SOHSTEN R. L., TEIXEIRA M., DOS SANTOS W. L., POMPEU M. L., MOREIRA R. A., OLIVEIRA J. T., CAVADA B.S., FALCOFF E., & BARRAL A. (1996) In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia braziliensis* em BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis* . *Acta Trop.* **60**, 237-250.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROS F. S., De MENEZES L. F., PINHEIRO A. A. S., SILVA E.F., LOPES A. H. C. S., De SOUZA W. & MEYER-FERNANDES J. R. (2000) Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*. Arch. Biochem. Biophys. **375**, 304-14.
- BERRÊDO-PINHO M., PERES-SAMPAIO C. E., CHRISPIM P. P. M., BELMONT-FIRPO R., LEMOS A. P., MARTINY A., VANNIER-SANTOS M. A. & MEYER-FERNANDES J. R. (2001) A Mg-dependent Ecto-ATPase in *Leishmania amazonensi* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. Archives of Biochemistry and Biophysics **391**, 16-24.
- BIAGGIONI I. (2004) Clinical and molecular pharmacologic characteristics of adenosine-induced vasodilation. Clinical Pharmacology & Therapeutics **75**, 137-139.
- BIRK A. V., BROEKMAN M J. & GLADEK E M. (2002) Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. J Lab Clin Med 166-175.
- BOGDAN C. & RÖLLINGHOFF M. (1999) How do protozoan parasites survive inside macrophages? Parasitology Today **15**, 22-27.
- BOWDRE J. H., CAMPBELL J. L. & WALKER D. (1981) American mucocutaneous Leishmaniasis. Culture of a *Leishmania* species from peripheral blood leukocytes. Am. J. Clin. Pathol. **75**, 435-438.
- CAMARGO L. B. & LANGONI H. (2006) Impact of leishmaniasis on public health. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. **12**, n.4, p.527-548.
- CHEN W & GUIDOTTI G. (2001) Soluble apyrases release ADP during ATP hydrolysis. Biochemical and Biophysical Research Communications **282**, 90-95.
- CHRISTENSEN L. D. & ANDERSEN V. (1992) Natural killer cells lack ecto 5' nucleotidase. Nat. Immun. **11**, 1-6.
- COHN C. S. & GOTTLIEB M. (1997) The acquisition of purines by Trypanosomatids. Parasitology Today **13**, 231-235.
- COLLIS M. G. (1989) The vasodilatador role of adenosine. Pharmac. Ther. **41**, 143-162.
- CONVIT J., PINARDI E. & RONDON (1972) Difuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **66**, 603-610.
- CUNNINGHAM A. C. (2002) Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. Experimental and Molecular Pathology **72**, 132-141.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DA SILVA R.P., HALL B. F., JOINER K. A. & SACKS D. L. (1989) CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania* major metacyclic promastigotes to human macrophages. *J. Immunol.* **143**, 617-622.
- DA SILVA R., & SACKS D.L. (1987) Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infection and Immunity*, **55**, 2802-2806.
- DE MARCO R., KOWALTOWSKI A. T., MORTARA R. A. & VERJOVSKI-ALMEIDA 2003) Molecular characterization and immunolocalization of *Schistosoma mansoni* TP diphosphohydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**, 831-838.
- DESCONTEAUX A. & TURCO S. J. (1999) Glyconjugate in *Leishmania* infectivity. *Biochimica et Biophysica Acta* **1455**, 341-352.
- DI VIRGILIO F. (2005) Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signalling* **1**, 205-209.
- DOMBROWSKI K. E., KE Y., BREWER K. A. & KAPP J.A.(1998) Ecto-ATPase an activation marker necessary for effector cell function. *Immunol. Rev.* **161**: 111-118.
- DOMBROWSKI K. E., KE Y., THOMPSON L. F. & KAPP J.A. (1995) Antigen recognition by CTL is dependent upon ectoATPase activity. *J. Immunol* **154**: 6227-6237.
- DÓREA R.C. C., BARBOZA-FILHO C. G., MOREIRA D. F., GUIRRO M., CHAVES A. A. M., DUNDER R. J., SOARES E. A., SANTOS-JÚNIOR V. & SPINOSA W. (2003) Behavior of *Leishmania major* metacyclic promastigotes during the course of infection and immune response development in resistant versus susceptible hosts. *Brazilian Journal of Microbiology* **34** (Suppl.1),17-20.
- EDLUND A., SIDEN A.& SOLLEVI A. (1987) Evidence for an anti-aggregatory effect of adenosine at physiological concentrations and for its role in the action of dipyridamole. *Tromb. Res.* **45**, 183-190.
- FIETTO J. L. R., De MARCO R., NASCIMENTO I. P., CASTRO I. M., CARVALHO T. M. U., De SOUZA W., BAHIA M. T., ALVES M. J.M., VERJOVSKI-ALMEIDA S.(2004) Characterization and immunolocalization of na NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **316**, 454-460.
- FIORENTINO D. F., BOND W. & MOSMANN R. (1989) Two types of mouse T helper cell IV: TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones. *J. Exp. Med.* **170**, 2081-2095.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FORD-HUTCHINSON A. W. (1982) Aggregation of rat neutrophils by nucleotide trifosphates. *Br. J. Pharmacol.* **76**,367-371.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE 2 (2000) Manual de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. FNS www.funasa.gov.br/pub/pub00.htm
- GORDON J. L. (1986) Extracelular ATP: effects, sources and fate. *Biochem. J.* **90**, 147-149.
- GOUNARIS K. & SELKIRK M. E. (2005) Parasite nucleotide-metabolizing enzymes and host purinergic signaling. *Trends in Parasitology* **21**, 17-21.
- GOUNARIS K., SELKIRK M.E., & SADEGHI S. J. (2004) A nucleotidase with unique catalytic properties is secreted by *Trichinella spiralis*. *Molecular & Biochemical Parasitology* **136**, 257-264.
- GRIFFITHS C. E. M., DEARMAN R. J., CUMBERBATCH & KIMBER I. (2005) Cytokines and Langerhans cell mobilisation in mouse and man. *Cytokine* **32**, 67-70.
- HANDA M. & GUIDOTTI G. (1996) Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*.) *Biochem. Biophys. Res. Commun* **218**, 916-923.
- HANDMAN E. & BULLEN V. R. D. (2002) Interaction of *Leishmania* with host macrophage. *Trends in Parasitology* **18**, 332-334.
- HASKÓ G. & SZABÓ C. (1998) Regulation of cytokine and chemokine production by transmitters and co-transmitters of autonomic nervous system. *Biochemical Pharmacology* **56**, 1079-1087.
- HEINZEL F. P., SADICK M. D., MUTHA S. S., HOLADAY B.J., COFMANN R.L. & LOCKSLEY R. M. (1989) Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during resolution or progression of murine leishmaniasis. *J. Exp. Med.* **169**, 59-72.
- HERAWLDT B. L. (1999) Leishmaniasis. *The Lancet* **354**, 1191-1199.
- HUNSUCKER A. S. MITCHELL B. S. & SPYCHALA J. (2005) The 5' nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacology & Therapeutics* **107**, 1-30.
- JESUS J. B., LOPES A. H. C.S. & MEYER-FERNANDES (2002) Characterization of na ecto-ATPase of *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Parasitology* **103**, 29-42.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- JI J., SUN J. & SOONG L. (2003) Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity* **71**, 4278-4288.
- JI J., MASTERSON J., SUN J. & SOONG L. (2005) CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *The Journal of Immunology* **174**, 7147-7153.
- JONES D. E., BUXBAUM L.U. & SCOTT P. (2000) IL-4 independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.* **165**, 364-372.
- KANE M. M. & MOSSER D. M. (2000) *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr. Opin. Hematol.* **7**, 26-31.
- KAVOOSI G., ARDESTANI S. K., KARIMINIA A., ABOLHASSANI M. & TURCO S. J (2006) *Leishmania major*: reactive oxygen species and interferon gamma induction by soluble lipophosphoglycan of stationary phase promastigotes. *Experimental Parasitology*.
- KILLICK-KENDRICK R. (1987) Methods for the study of phlebotomine sandflies. In *The leishmaniasis in biology and medicine*. 1 Ed. Eds W. Peters & R. Killick-Kendrick. London: Academic Press. pp. 473-497.
- KIMA P. E., CONSTANT S. L., HANNUM L., COLMENARES M., LEE K. S., HABERMAN M. A. M., SHLOMCHIK M. J. & McMAHON-PRATT (2000) Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* **191**, 1063-1068.
- KUROKI M. & MINAKAMI S. (1989) Extracellular ATP triggers superoxide production in human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Contm.* **162**, 377-380.
- LA SALA A., FERRARI D., Di VIRGILIO F., IDSKO M., NORGAUER J. & GIROLOMI G. (2003) Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J Leukoc Biol* **73**, 339-343.
- LEMOA A. P., PINHEIRO A. A., BERRÊDO-PINHO M., FONSECA DE SOUZA A. L., MOTTA M. C., DE SOUZA W. & MEYER-FERNANDES J. R. (2002) Ectonucleotide diphosphohydrolase activity in *Crithidia deanei*. *Parasitol. Res.* **88**, 905-911.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LE MOINE O., STORDEUR P. & SCHANDENE L. (1996) Adenosine enhances IL-10 secretion by human monocytes. *J Immunol* **156**, 4408-4414.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. & RANDAL R. J. (1951) Protein measurement with the folinphenol reagent. *J. Biol. Chem* **193**, 265-275.
- MAIOLI T. U., TAKANE E., ARANTES R. M. E., FIETTO J. L. R. & AFONSO L. C. C. (2004) Immune response induced by new world *Leishmania* species in C57BL/6 mice. *Parasitol. Res.* **94** 207-212.
- MAJUMDAR S. & AGGARWAL B B. (2003) Adenosine suppresses activation of nuclear factor κ B selectively induced by tumor necrosis factor in different cell types. *Oncogene* **22**, 1206-1218.
- MARTINEZ J. E., ARIAS A.L. & ESCOBAR M. A. (1992) Haemoculture of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from two cases of mucosal leishmaniasis: Re-examination of haematogenous dissemination. *Trans.R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**, 392-394.
- MARZOCHI, M. C. A. & MARZOCHI, K. B. F. (1994) Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging Anthrozoosis and Possibilities for Their Control. *Cad. Saúde Públ., Riode Janeiro*, **10** (supplement 2), 359-375, 1994.
- MATOS J. A. A., BORGES F. P., TASCIA T., BOGO M. R., De CARLI G. A., FAUTH M. G., DIAS R. D. & BONAN C. D. (2001) Characterisation of na ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. *International Journal for Parasitology* **31**, 770-775.
- MBOW M. L., BLEYENBERG J. A., HALL L. R. & TITUS R. G. (1998) *Phlebotomus papatasi* sand fly gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *The Journal of Immunology* **161**, 5571-5577.
- MEBRATU Y. B., VAN E. G., GUIZANI I., LAWYER P. G., PAMBA H. & KOECH D. (1993) Human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* s.l. in Kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**, 598-601.
- MEYER-FERNANDES J.R., DUTRA P. M. L., RODRIGUES C. O., SAAD-NEHME J., & LOPES A. H. C. S. (1997) Mg-dependent ecto-ATPase activity in *Leishmania tropica*. *Arch. Biochem. Biophys.* **341**, 40-46.
- MEYER-FERNANDES J. R. (2002) Ecto-ATPases in protozoa parasites: looking for a function. *Parasitology International* **51**, 299-203.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MEYER-FERNANDES J. R., SAAD-NEHME J., PERES-SAMPAIO C. E., BELMONT-FIRPO R., BISAGGIO R., COUTO D. F. R., COUTO L. C., SANTOS A. L. F., LOPES A. H. S. C. & SOUTO-PÁDRON T. (2004) A Mg-dependent ecto-ATPase is increased in the stages infectives of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Res. **93**, 567-576.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (2002) Secretaria de políticas de saúde. Departamento de atenção básica. Dermatologia na atenção básica / Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde- 1ª edição- Brasília; Ministério da Saúde.
- MIZUMOTO N., KUMAMOTO T., ROBSON S. C., SÉVIGNY J., MATSUE H., ENJYOJI K & TAKASHIMA A. (2002) CD39 is the dominant Langerhans cell associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. Nat. Med. **8**, 358-365.
- MOSMANN T. R., CHERWINSKI H., BOND M. W., GIEDLIN M. A. & COFFMAN R. L. (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol. **136**, 2348-2357.
- MCCMAHON-PRATT D. & ALEXANDER J. (2004) Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for new world cutaneous leishmaniases or the visceral disease? Immunological Reviews **201**, 206-224.
- MOSMANN T. R. & COFFMAN R. L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu. Rev. Immunol, **7**, 145-173.
- MOSSER D. & EDELSON P. J. (1985) The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. J. Immunol. **135**, 2785-2789.
- MOURA T. R., NOVAIS F. O., OLIVEIRA F., CLARÊNCIO J., NORONHA A., BARRAL A. BRODSKY C. & OLIVEIRA C. I. (2005) Toward a novel experimental model of infection to study american cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. Infection and Immunity **73**, 5827-5834.
- NADERER T., VINCE J. E. & McCONVILLE M. J. (2004) Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. Current Molecular Medicine **4**, 649-665.
- NAKAAR V., BECKERS C. J. M., POLOTSKY K. & JOINER K.A. (1998) Basis for substrate specificity of the *Toxoplasma gondii* nucleotide triphosphate hydrolase. Mol. Biochem. Parasitol. **97**, 209-220.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- NUWAYRI-SALTI N., MUATASSEM D. & SALMAN S. (1992) Chronic cutaneous leishmaniasis: *Leishmania* parasites in blood. *Int. Dermatol.* **31**, 562.
- OLIVEIRA C. I., TEIXEIRA M. J., TEIXEIRA C. R., JESUS J.R., ROSATO A. B. SILVA J.S. BRODSKYN C., BARRAL-NETO M. & BARRAL A. (2004) *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/ c mice. *Microbes and infection* **6**, 977-984.
- OVERATH P. & AEBISCHER T. (1999) Antigen presentation by macrophages harboring intravesicular pathogens. *Parasitol. Today* **15**: 325-332.
- PERES-SAMPAIO C. E., THORP-PALUMBO S., & MEYER-FERNANDES J.R. (2001) An ecto ATPase activity present in *Leishmania tropica* stimulated by dextran sulfate. *Z Naturforsch Teil C* **56**, 820-825.
- PINHEIRO C. M., MARTINS-DUARTE E. S., FERRARO R.B., FONSECA DE SOUZA A. L., GOMES M. T., LOPES A. H. C. S., VANNIER-SANTOS M. A., SANTOS A. L. S. & MEYER-FERNANDES J.R. (2006) *Leishmania amazonensis*: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. *Experimental Parasitology*. www.sciencedirect.com.
- PLESNER L. (1995) Ecto-ATPases: identities and functions. *Int. Rev. Cytol.* **158**, 141-214.
- RADVİN J. I. & GUERRANT R. L. (1981) Role of adherence in citopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* **68**, 1305-1313.
- RALEVIC V. & BURNSTOCK G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines . *Pharmacol. Rev.* **50**, 413-492.
- RAY M., G AM A.A., BOYKINS R. A. & KENNEY R. T. (2000) Inhibition of interferon-gamma signaling by *Leishmania donovani* . *J. Infect. Dis.* **181**: 1121-1128.
- RIBEIRO J.M.C., ROWTON E.D.& CHARLAB R. (2000) The salivary 5'-nucleotidase / phosphodiesterase of the hematophagus sand lutzomyia fly, *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 279-285.
- RIBEIRO J. M. C. (1995) Blood-feeding artrophods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect. Agents Dis.* **4**, 143-152.
- RIBEIRO J. M. C. (1987) Role of arthropod saliva in blood feeding. *Ann. Rev. Entomol.* **32**, 463-478.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- RIBEIRO J. M. C., MODI G. B. & RESH R. B. (1989) Salivary apyrase activity of some old world phlebotominae sand flies. *Insect Biochem.* **19**, 409-412.
- ROSS R. (1903) (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.
- SAVIC V., STEFANOVIC V., ARDAILLOU N. & ARDAILLOU R. (1990) Induction of ecto 5'-nucleotidase of rat cultured mesangial cells by interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alfa. *Immunology* **70**, 321-326.
- SCOTT P., NATOVITZ P., COFFMAN R. L., PEARCE E. & SHER A. (1988) Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J. Exp. Med.* **168**, 1675-1684.
- SCOTT P. (1991) IFN- γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.* **147**, 3149-3155.
- SINGH S. & SIVAKUMAR R. (2004) Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J. Infect Chemother* **10**, 307-315.
- SOUZA-NETO S. M., CARNEIRO C. M., VIEIRA L. Q. & AFONSO L. C. C. (2004) *Leishmania braziliensis*: Partial control of experimental infection by interleukin-12 p40 deficient mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **99**, 289-294.
- SCHNURR M., THEN F., GALAMBOS P., SCHOLZ P. SIEGMUND B., ENDRES S. & EIGLER A. (2000) Extracellular ATP and TNF alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. *J. Immunol.* **165**, 4704-4709.
- SCHULTE E. II, SÉVIGNY J., KACZMAREK E., SIEGEL J. B. IMAI M., KOZIAK K., BEAUDOIN A. R. & ROBSON S. C. (1999) Structural elements and limited proteolysis of CD 39 influence ATP diphosphohydrolase activity. *Biochemistry* **38**, 2248-2258.
- SPYCHALA J. (2000) Tumor promoting functions of adenosine. *Pharmacol. Ther.* **87** (2-3), 161-173.
- SYNNESTEVDT K., FURUTA G T. & COMERFORD K M., (2002) Ecto-5' nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest* **110**, 993-1002.
- STEIGER R.F., STEIGER E. (1977) Cultivation of *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis* in defined media: nutritional requirements. *Journal of Protozoology* **24**, 437-441.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- TAUSSKY H.H. & SHORR E. (1953) A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *Journal of Biological Chemistry* **202**, 675-685.
- VASCONCELOS E.G., NASCIMENTO P. S., MEIRELLES M. N. L., VERJOVSKI-ALMEIDA S. & FERREIRA S. T. (1993) Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase on the external surface of tegument of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**, 205-214.
- VASCONCELOS E. G., FERREIRA S.T., CARVALHO T. M.U., De SOUZA W., KETTLUM A. M., MANCILLA M., VALENZUELA M. A. & VERJOVSKI-ALMEIDA (1996) Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **36**, 22139-22145.
- WEIGLE K. & SARAVIA N. G. (1996) Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in new world cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology* **14**, 433-450.
- WHO. World Health Organization. (2007).
Electronic Citation: [http:// who.int/ emc/diseases/leish/index/html](http://who.int/emc/diseases/leish/index/html)
- WILSON M. E., JERONIMO S. M.B. & PEARSON R. (2005) Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microbial Pathogenesis* **38**, 147-160.
- ZANDBERGEN G. V., BOLLINGER A., WENZEL A., KAMHAWI S., VOLL R., KLINGER M., MÜLLER A., HÖLSCHER C., HERRMANN M., SACKS D., SOLBACH W., & LASKAY T. (2006) *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *PNAS* **103**, 13837-13842.
- ZIMMERMANN H. (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **362**, 299-309.
- ZIMMERMANN H. (1996) Extracellular purine metabolism. *Drug Dev Res* **39**, 337-352.
- ZIMMERMANN H. (1992) 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* **285**, 345-365.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)