



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

**CARACTERIZAÇÃO LIPÍDICA DE DUAS CEPAS DE
Leishmania (Viannia) braziliensis CAUSADORAS DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

AMANDA ANASTÁCIA PINTO HAGE
Biomédica

BELÉM - PARÁ - BRASIL
2013

**CARACTERIZAÇÃO LIPÍDICA DE DUAS CEPAS DE
Leishmania (Viannia) braziliensis CAUSADORAS DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

AMANDA ANASTÁCIA PINTO HAGE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

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

BELÉM - PARÁ - BRASIL

2013

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

Hage, Amanda Anastácia Pinto, 1988-
Caracterização lipídica de duas cepas de
leishmania (Viannia) braziliensis causadoras da
leishmaniose tegumentar americana / Amanda
Anastácia Pinto Hage. - 2013.

Orientadora: Edilene Oliveira da Silva.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
do Pará, Instituto de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e
Biologia Celular, Belém, 2013.

1. Leishmania. 2. Leishmania braziliensis. 3.
Leishmaniose. I. Título.

CDD 22. ed. 579.4

**CARACTERIZAÇÃO LIPÍDICA DE DUAS CEPAS DE
Leishmania (Viannia) braziliensis CAUSADORAS DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

Por

AMANDA ANASTÁCIA PINTO HAGE

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Banca examinadora: Membro: **Prof^ª. Dr^ª. Sanny Helena Valente de Oliveira Alberio**
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – UEPA

Membro: **Prof. Dr. Moysés dos Santos Miranda**
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

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

Belém (PA), 24 de Maio de 2013.

“O mais importante de tudo é nunca deixar de se perguntar. A curiosidade tem sua própria razão de existir.” (Albert Einstein).

*À minha mãe, por todo amor e toda dedicação ao
longo da vida,
Ao meu pai pelo apoio, incentivo e confiança,
Aos meus seis irmãos por todo carinho e
atenção...*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Deus por ter me concedido paciência, sabedoria e saúde para a realização desse trabalho.

À minha mãe, Maria Nely, exemplo de mulher e mãe, por todo amor, carinho e plena dedicação, por acreditar em meus sonhos e me incentivar a realizá-los de maneira correta, sem perder o caráter. Obrigada por tudo, minha mãe! Te amo muito!!

Ao meu pai, Armando Hage Jr., por proporcionar minha educação, tanto escolar quanto moral, ensinando a nunca duvidar da própria capacidade e sempre cumprir com nossas responsabilidades.

Aos meus 6 irmãos amados (Armando, Aristides, Luana, Camila, Flávia e André Luis), que embora algumas vezes distante, sempre me apoiaram, torcendo pelo meu sucesso e assim sei que continuará. Um agradecimento especial ao meu mano mais velho (que parece não sair dos 20 anos) Armando Hage Filho, por fazer parte da formação do meu caráter desde a infância. Agradeço por todo seu carinho (ou não.. hehehe), atenção, puxões de orelha, pelos vários diálogos produtivos, pelos momentos de lazer (academia, cinemas, shows, Old school, e outros), por VÁRIAS vezes, pelo apoio financeiro e principalmente, pela confiança. Sendo muita das vezes mais que um irmão, também um pai.

Ao meu namorado e amigo, Paulo Sérgio Bento Jr., que durante 4 anos vem me apoiando, incentivando e ajudando de todas as formas que pode para que eu conquiste meus sonhos e realização profissional. Obrigada por não medir esforços em me buscar no ICB, altas horas da noite, pelas esperas até término de experimentos e seminários no laboratório, por impressão de artigos, empréstimo de internet, correção de referências, etc.. E só para constar, para um publicitário, tá sabendo muito sobre leishmanioses! ☺ Te amo muito!

À Prof^ª. Dr^ª. Edilene, por mais uma oportunidade no laboratório de parasitologia e biologia estrutural, agora como aluna de mestrado. Por ter me acolhido desde a iniciação científica e durante a tese de conclusão de curso, pelo incentivo à pesquisa, à participação em eventos nacionais e internacionais, e ao aprendizado adquirido durante a realização deste trabalho.

À todos do Laboratório de Parasitologia, pelo companheirismo e momentos de descontração. São eles: Raquel Raick, amiga das ‘antigas’, que acompanhei a sua formação e agora estamos terminando mais uma etapa. Obrigada pela amizade, pela companhia de todos os dias e durante nosso mestrado sanduíche na UFRJ, acompanhado de alegrias, diversões,

tristezas e estresses! Sabes que mesmo você sendo chata, pode contar comigo, sempre; Josineide Pantoja.. Sempre doce e gentil. Uma pessoa que admiro imensamente, até já te citei em uma *composition* no curso de inglês, como uma das pessoas que mais admiro. Contigo aprendo a manter a humildade, determinação e fé; ex-integrante do nosso grupo, Camila Abdon, chegou como uma estagiária muito abusada, mas conquistou meu coração e se tornou uma grande amiga. Saudades de ti, bandida! Carol Martins, a bonequinha do laboratório, “nada” impulsiva e muito verdadeira, obrigada por todas as conversas e pela amizade construída. Paula Frade e Bruno Martins, a segunda dupla do lab (B1 e B2), obrigada pela amizade, pela ajuda SEMPRE quando necessária, pelas mentiras e fofocas que animam cada dia! Ao Rodriguinho.. das ‘antigas’ também, mas que só agora percebi o quanto é amigo e verdadeiro, é o nosso lado pessimista, ou melhor, realista do lab, além de ser o nosso guia turístico no RJ. Lienne e Jorginho, a mais nova dupla, sendo a terceira do lab, obrigada pelo apoio, ajuda, conversas e amizade. Jorge, ME PERDOA!! Sabes o que estou dizendo!; Ana e Luis, não somente a primeira dupla que conheci no lab, o casal, agora noivos! Precisava ser lembrado. Obrigada pelas caronas, pelas conversas, pelas dicas, conselhos, ajudas, ensinamentos e momentos de desabafo que existiram desde 2007; Davi, obrigada pelas compras de material, pelos papos durante o café e pelas ótimas histórias de infância, que só tu podes contar. Fernanda, obrigada pelas soluções e trocas de Epon no LBE; Aprígio, por todas as leishmanias que pode transportar para o lab quando eram extremamente necessárias; e aos novos estagiários, Evelen, Sandro e Ingrid, mesmo com pouco convívio já puderam participar de bons momentos. Obrigada de coração!

Ao Instituto Evandro Chagas, por todas as cepas de leishmania fornecidas.

À CAPES e ao INBEB, pelo importante suporte financeiro.

Ao Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer/UFRJ e ao Dr. Wanderley de Souza, por disponibilizar a utilização de equipamentos para realização de alguns experimentos desse trabalho. À Miria Pereira, pela discussão de dados e ensinamentos durante a estadia no laboratório, e à Rachel Rachid pelo ótima companhia e ajuda técnica.

À Geórgia Atella e a Nuccia De Cicco, pela disponibilidade e ensinamento da técnica de HPTLC para caracterização lipídica realizada no Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E QUADROS
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....
RESUMO.....
ABSTRACT
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ASPECTOS GERAIS	1
1.2. TAXONOMIA DO GÊNERO LEISHMANIA.....	1
1.3. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	3
1.4. LEISHMANIA SP.....	6
1.4.1. Morfologia.....	6
1.4.2. Ciclo biológico.....	8
1.4.3. Principais organelas e estruturas citoplasmáticas do parasito	10
1.5. CORPOS LIPÍDICOS	12
1.5.1. Corpos lipídicos e células de mamíferos	14
1.5.2. Corpos lipídicos e patógenos.....	15
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. OBJETIVO GERAL.....	20
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. CULTIVO E MANUTENÇÃO DO PARASITO	21
4.2. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DO PARASITO	21
4.3. IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS DO PARASITO.....	22
4.3.1. Citoquímica pelo método ósmio-imidazol.....	22
4.3.2. Quantificação de CLs por citometria de fluxo utilizando Bodipy® 493/503	22
4.4. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA POR HPTLC DOS PARASITOS.....	23
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
5. RESULTADOS	24
5.1. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DO PARASITO	24
5.2. IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS DO PARASITO.....	26
5.2.1. Citoquímica pelo método ósmio-imidazol.....	26
5.2.2. Quantificação de CLs por citometria de fluxo	28
5.3. ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO DOS PARASITOS	31
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÕES.....	37
8. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS	38
9. MESTRADO SANDUÍCHE	38
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXOS	49

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1: Taxonomia do parasito <i>Leishmania</i>	2
Figura 2: Aspecto clínico da LCL com lesão ulcerada, com base eritematosa infiltrada e crostas	4
Figura 3: Aspecto clínico da LMC com ulceração na fossa nasal e destruição da mucosa oral	5
Figura 4: Principais formas evolutivas do protozoário do gênero <i>Leishmania</i> sp	7
Figura 5: Ciclo de vida do parasita do gênero <i>Leishmania</i>	9
Figura 6: Estrutura de um corpo lipídico por Microscopia Eletrônica de Transmissão	14
Figura 7: Representação esquemática da formação de CLs mediada por patógenos intracelulares, translocação de CLs para fagossomos e possíveis consequências da interação de CLs e patógenos	18
Figura 8: Forma promastigota das cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i> em diferentes fases do crescimento <i>in vitro</i> por MET	25
Figura 9: Identificação citoquímica ultraestrutural de CLs pelo método ósmio-imidazol em parasitos das cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i> em diferentes fases do crescimento <i>in vitro</i>	27
Figura 10: Histogramas representando a captação de Bodipy® 493/503 e IP pelos parasitos das cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i> nas diferentes fases do crescimento <i>in vitro</i>	29
Figura 11: Intensidade média de fluorescência dos parasitos das cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i> incubados com Bodipy® 493/503 em diferentes fases do crescimento <i>in vitro</i>	30
Figura 12: Gráfico demonstrando a distribuição de lipídios totais em promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> responsáveis pela LCL e LMC nas fases EST-I e EST-T	31
Figura 13: Gráfico demonstrando a distribuição de lipídios totais em promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> responsáveis pela LCL e LMC nas fases EST-I e EST-T	32
Quadro 1: Espécies de <i>Leishmania</i> frequentes no Brasil.	3

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μm – Micrometros
AA – Ácido araquidônico
ACAT – Acil-CoA colesterol aciltransferase
ADRP – Proteína relacionada à diferenciação de adipócitos
BSA – Soro albumina bovina
CCT – CTP-fosfocolina-citidiltransferase
CLs – Corpos lipídicos
COX – Ciclooxygenase
DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol
DGAT – Acil-CoA diacilglicerol aciltransferase
DNA – Sigla inglesa para ácido desoxirribonucléico
EST-I – Fase estacionária inicial do crescimento
EST-T – Fase estacionária tardia do crescimento
FC – Fosfatidilcolina
FL – Fosfolipídios
AG – Ácidos graxos livres
GTPase – Guanosina trifosfatase
HPTLC – Sigla inglesa para cromatografia em camada delgada de alta resolução
IgG – Imunoglobulina G
IL – Interleucina
INF- γ – Interferon - γ
IP – Iodeto de propídio
LCD – Leishmaniose cutâneo difusa
LCL – Leishmaniose cutânea localizada
LMC – Leishmaniose mucocutânea
LO – Lipoxigenase
LTA – Leishmaniose tegumentar americana
LTC₄ – Leucotrieno C₄
LV – Leishmaniose visceral
MET – Microscopia eletrônica de transmissão
NNN – Neal, Novy e Nicolle
OMS – Organização mundial da saúde
PAT – Perilipina, ADRP, TIP47
PBS – Sigla inglesa para tampão fosfato salino
PGE₂ – Prostaglandina E₂
PHEM – PIPES, HEPES, EGTA e Magnésio
RE – Retículo endoplasmático
RPMI – Roswell Park Memorial Institute
SBF – Soro bovino fetal
SFM – Sistema fagocítico mononuclear
TG – Triglicerídeos
TNF- α – Sigla inglesa para fator de necrose tumoral
TIP47 – Proteína de interação de cauda de 47 kDa
VLDL – Very low density lipoprotein

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) constitui uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania* com elevada incidência na região Amazônica. Uma variedade de espécies de leishmania é responsável por esta patologia. Desta forma, dependendo da espécie e da resposta imunológica do hospedeiro vertebrado, a doença pode apresentar diferentes formas clínicas, como a leishmaniose cutânea localizada (LCL) e a leishmaniose mucocutânea (LMC). A principal espécie responsável pela LTA é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Contudo, devido à existência de uma multiplicidade de cepas desta espécie e ao reduzido número de estudos relacionados, torna-se importante o conhecimento dos aspectos metabólicos básicos do protozoário, como o metabolismo lipídico, na tentativa de caracterizar vias ou componentes fundamentais para seu desenvolvimento e infectividade. Desta forma, este trabalho teve como objetivo analisar distribuição de corpos lipídicos (CLs) e o perfil lipídico de duas cepas de *L. (V.) braziliensis*, isolada de diferentes casos clínicos, em diferentes períodos da fase estacionária do crescimento celular. As formas promastigotas das cepas M17593 (LCL) e M17323 (LMC) de *L. (V.) braziliensis* foram utilizadas na fase estacionária inicial (EST-I) e estacionária tardia (EST-T) de crescimento. Inicialmente, foi realizada análise ultraestrutural das formas promastigotas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e foram observadas estruturas sugestivas de CLs distribuídos no citoplasma do parasito, confirmados pela técnica citoquímica ósmio-imidazol, organelas necessárias para o metabolismo energético do parasito. Para quantificar a distribuição de CLs entre os dias de cultivo e entre as cepas, foi realizada análise por citometria de fluxo com Bodipy[®] 493/503. Os resultados indicaram que a cepa responsável pela LMC apresentou maior quantidade de CLs durante a fase estacionária tardia. Na cepa LCL não foi observado diferença significativa entre as fases estudadas. Assim, pode ser sugerido que a exacerbada resposta inflamatória que ocorre em pacientes com LMC, esteja relacionada com o acúmulo de CLs no parasito, fonte de energia e eicosanoides, como prostaglandinas. Outra hipótese é a possível correlação de CLs com a baixa exposição do fosfolípido fosfatidilserina para a superfície externa da membrana, importante para a infectividade do parasito. Para análise dos lipídios totais, os parasitos foram submetidos à extração lipídica, seguido da técnica de HPTLC, onde foram encontrados predominantemente fosfolipídios, esterol esterificado, esteróis, triglicerídeos e ácidos graxos compondo o parasito, com variações entre as cepas e entre as fases estudadas. A cepa LCL na fase estacionária tardia possui maior quantidade de lipídios totais, que pode ser justificado por já ser conhecida como a cepa mais infectiva e possivelmente apresentar maior quantidade de glicoconjugados associados com subdomínios lipídicos importantes para o reconhecimento de fagócitos. É importante ressaltar que a maior infectividade da cepa LCL quando comparada à cepa LMC, resulta em um menor processo inflamatório. Estes resultados indicam que há uma variação no perfil lipídico e na distribuição de CLs entre as diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis*, que pode estar relacionado com a infectividade do parasito e com a manifestação clínica da doença.

Palavras-chave: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, cepas, corpos lipídicos, manifestação clínica.

ABSTRACT

The American cutaneous leishmaniasis (ACL) is an infectious disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* with high incidence in the Amazon region. A variety of leishmania species are responsible for this pathology. Thus, depending on the species and the immune response of the vertebrate host, the disease can display different clinical forms, including localized cutaneous leishmaniasis (LCL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL). The main species responsible for the LTA is *Leishmania (Viannia) braziliensis*. However, due to the existence of a multiplicity of strains of this species and reduced number of related studies, it is important to know the basic metabolic aspects of the protozoa such as lipid metabolism in an attempt to characterize pathways or components essential to their development and infectivity. This study aimed to analyze the distribution of lipid droplets (LD) and lipid profile of two strains of *L. (V.) braziliensis* isolated from different clinical cases at different periods of the stationary phase of cell growth. The promastigotes of strains M17593 (LCL) and M17323 (LMC) of *L. (V.) braziliensis* were used in early stationary phase (STAT-E) and late stationary (STAT-L) of the growth. Initially, an ultrastructural analysis of promastigotes by transmission electron microscopy (TEM) was performed and we could observe structures suggestive of LD distributed in the cytoplasm of the parasite, confirmed by imidazole-osmium cytochemical technique, organelles required for energy metabolism of the parasite. To quantify the LD distribution between the days of cultivation and between the different strains, analysis was performed by flow cytometry with BODIPY® 493/503. The results showed that the MCL strain had a higher amount of LD during the late stationary phase. In LCL strain no significant difference was observed between the phases studied. Thus, it can be suggested that the increase in inflammatory response that occurs in patients with MCL, is associated with LD accumulation in the parasite, energy and eicosanoids source, such as prostaglandins. Another hypothesis is the possible correlation between LD and the low phosphatidylserine exposure to the external surface of the membrane, important to parasite infectivity. For the total lipids analysis, parasites were subjected to lipid extraction, followed by HPTLC technique, which were found predominantly phospholipids, sterol esterified, sterols, triglycerides and fatty acids composing the parasite, with variations between strains and between phases studied. The LCL strain in late stationary phase has a higher amount of total lipids, which can be explained because this strain is already known as the infective one, and possibly presents high quantities of glycoconjugates associated with lipid subdomains important for the recognition of phagocytes. It is important to know the high infectivity of LCL strain compared to MCL strain, results in less inflammation. These results indicate that the difference in lipid profile and LD distribution between different strains of *L. (V.) braziliensis*, which may be related to the parasite infectivity and the clinical manifestation of the disease.

Keywords: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, strains, lipid droplets, clinical manifestation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS

As leishmanioses constituem um conjunto de doenças causadas pela infecção por protozoários parasitos do gênero *Leishmania* (NEUBER, 2008). São consideradas antroponoses, na qual vinte espécies são patogênicas ao homem e são transmitidos através da picada de insetos vetores hematófagos insetos dípteros denominados flebotomíneos, os quais pertencem a trinta espécies (WHO, 2012). Dependendo da espécie do protozoário e da resposta imunológica, essas patologias podem se apresentar sob três formas clínicas principais: cutânea, mucocutânea e visceral, que abrangem uma ampla variedade de sinais, sintomas e diferentes níveis de severidade (GRIMALDI JR. & TESH, 1993).

Esta parasitose é um sério problema de saúde pública, considerada endêmica em 98 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento, com 12 milhões de pessoas infectadas. Cerca de dois milhões de novos casos são relatados anualmente (1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500.000 de leishmaniose visceral), principalmente nas Américas, na Ásia e na África. Dados epidemiológicos indicam que 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão. Em relação à leishmaniose mucocutânea, 90% dos casos ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru e 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (WHO, 2012). De acordo com esses dados, o Brasil está entre os países com maior incidência das três formas clínicas das leishmanioses, o que confirma o caráter endêmico nacional da doença.

1.2. TAXONOMIA DO GÊNERO *LEISHMANIA*

O gênero *Leishmania* (Ross, 1903) pertence à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, e desde a sua criação vários esquemas de classificação taxonômica foram propostos devido ao crescente número de espécies identificadas, bem como suas características intrínsecas e extrínsecas (GRIMALDI JR. & TESH, 1993). As classificações

mais utilizadas seguem o modelo taxonômico proposto por Lainson & Shaw (1987) que dividem as leishmanias nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (figura 1).

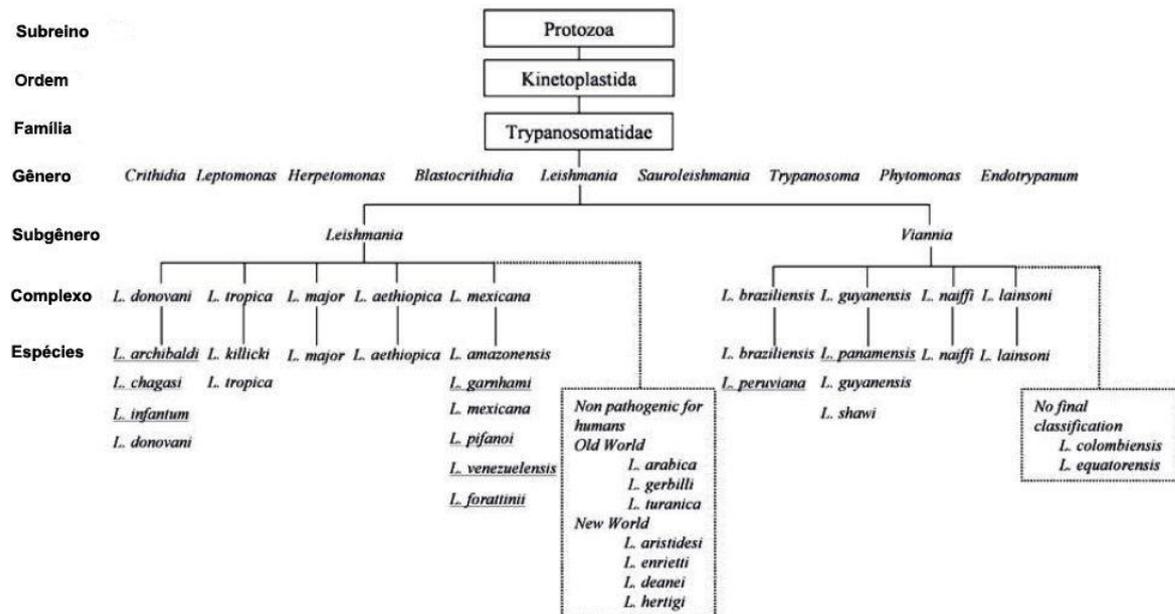


Figura 1: Taxonomia do parasito Leishmania. Fonte: BAÑULS et al., 2007 (modificada).

Existe uma variedade de espécies de leishmania distribuídas pelo mundo e cada uma apresenta particularidades concernentes às manifestações clínicas, aos vetores, reservatórios, padrões epidemiológicos, a distribuição geográfica e até mesmo a resposta terapêutica (VALE & FURTADO, 2005; BRASIL, 2007).

No Brasil são conhecidas oito espécies de leishmanias responsáveis por doença humana (Quadro 1). A espécie *L. (V.) braziliensis* é responsável pela forma tegumentar e apresenta distribuição em todo o território nacional, além de vários países da América Central e do Sul (de Belize até a Argentina), sendo provável que nem todos os casos da doença correspondam exatamente ao mesmo parasita, mas que exista um complexo de subespécies (BASANO & CAMARGO, 2004).

Quadro 1: Espécies de *Leishmania* frequentes no Brasil.

	Forma Clínica	Distribuição Geográfica
<i>Leishmania</i> sp. do Novo Mundo		
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	LCL, LMC	Américas do Sul e Central, México
<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	LCL	América do Sul
<i>L. (Viannia) lainsoni</i>	LCL	América do Sul
<i>L. (Viannia) naiffi</i>	LCL	América do Sul
<i>L. (Viannia) lindenbergi</i>	LCL	América do Sul
<i>L. (Viannia) shawi</i>	LCL	América do Sul
<i>L. (Leishmania) chagasi</i>	LV	Américas do Norte, Central e Sul
<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	LCL, LCD	América do Sul

LCL: Leishmaniose Cutânea Localizada; LMC: Leishmaniose Mucocutânea; LCD: Leishmaniose Cutânea Difusa; LV: Leishmaniose Visceral.

Fonte: REINTHINGER et al., 2007 (modificada).

1.3. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é umas das manifestações mais frequentes de infecção com 75 % de todos os casos registrados. Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, somente no ano de 2010, foram notificados 21.981 casos de LTA. As regiões Nordeste e Norte apresentaram maior incidência, apresentando 40% e 32% dos casos registrados, respectivamente. Na região Norte, os estados do Pará, Amazonas e Acre foram predominantes, onde só no estado do Pará, em 2008, foram notificados 3.623 casos; em 2009, 3.347, e no ano de 2010, 2.331 casos, que confirmam o caráter endêmico da doença no Estado (BRASIL, 2011).

Atualmente, na Amazônia brasileira, as principais espécies de leishmania responsáveis pela LTA são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) lindenbergi*, *Leishmania (Viannia) naiffi* (BRASIL, 2006; SILVEIRA et al., 2008; DE OLIVEIRA & BRODSKYN, 2012). Dependendo da espécie ou até mesmo da cepa do parasito e da resposta imunológica celular do indivíduo infectado a doença pode manifestar diferentes formas clínicas. A espécie predominante nas regiões endêmicas do Brasil é a *L. (V.) braziliensis* (GOMES-SILVA et al. 2007) que é a principal responsável pelos casos de leishmaniose cutânea localizada e leishmaniose mucocutânea registrados (SILVEIRA et al., 2004).

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a forma mais frequente da doença, caracterizada pela presença de úlceras únicas ou múltiplas na pele, com bordas infiltradas e eritematosas, de fundo granuloso, localizadas principalmente nas áreas expostas do corpo

(figura 2) (SILVEIRA et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2008). A lesão provocada pela espécie *L. (V.) braziliensis* apresenta uma infiltração modesta com escassos macrófagos e parasitos (MORGADO et al., 2008). Imunologicamente a LCL se caracteriza principalmente pela resposta imune através das células T CD4⁺ e CD8⁺ tanto em pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* quanto naqueles com *L. (L.) amazonensis*, também responsável pela LCL, porém a resposta imune provocada pela primeira espécie apresenta maior expressão de INF- γ e baixa ou nenhuma expressão de IL-4 nas lesões dos pacientes infectados (SILVEIRA et al., 2004).



Figura 2: Aspecto clínico da LCL com lesão ulcerada, com base eritematosa infiltrada e crostas. Fonte: REINTHINGER et al., 2007 (modificada).

A leishmaniose mucocutânea (LMC) desenvolve-se a partir de uma complicação da LCL, na qual protozoários são disseminados pelo sistema linfático e parasitam o trato mucoso. É caracterizada por lesões ulceradas e infiltradas na mucosa oral, nasal, faríngea e laríngea, com comprometimento em torno da mucosa nasal (figura 3) (NOGUEIRA et al., 2008; SAKTHIANANDESWAREN et al., 2009). Está associada com a exacerbada resposta imune celular, sendo novamente mais intensa a resposta causada pela espécie *L. (V.) braziliensis* quando comparada com outras espécies do mesmo subgênero (SILVEIRA et al., 2004). Seu aspecto imunológico tem como característica a presença predominante de células T CD4⁺ nas lesões em detrimento das células T CD8⁺ (ESTERRE et al., 1994). De forma similar ao que acontece na LCL, os níveis de INF- γ e TNF- α nas lesões são bem elevados

enquanto que os níveis de IL-4 e IL-10 permanecem baixos, o que contribui para a exacerbação da resposta imune inflamatória do hospedeiro (GOMES-SILVA et al., 2007).



Figura 3: Aspecto clínico da LMC com ulceração na fossa nasal e destruição da mucosa oral. Fonte: REINTHINGER et al., 2007 (modificada).

CAMPOS et al. (2008) confirmam que pode haver variação da infectividade *in vitro* entre cepas da espécie *L. (V.) braziliensis* de pacientes com diferentes formas clínicas de LTA. Nesse estudo, cepas de pacientes com LCL apresentam baixo grau de infectividade quando comparada às cepas isoladas de paciente com LMC, forma mais severa da LTA. Esta variação na espécie pode estar diretamente relacionada à forma clínica da doença causada por este parasito.

Entretanto, estudos realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram que parasitos de cepa responsável pela LCL, forma mais branda da doença, são os que apresentam alto grau de infectividade, quando comparados com parasitos da cepa que causa LMC (FARIAS et al., 2013). Nesse estudo, foi analisada a exposição do fosfolípido fosfatidilserina (FS) na superfície de promastigotas dessas cepas. Parasitos da cepa LCL apresentaram maior exposição do fosfolípido sem apresentar morte celular por apoptose, sendo, portanto, uma molécula importante para a infectividade do parasito. A FS é um fosfolípido encontrado na superfície de células apoptóticas, que estimula a atividade fagocítica de macrófagos, inibindo sua reação inflamatória. A *L. (V.) braziliensis* é capaz de expor esse fosfolípido, o que

auxilia a internalização de promastigotas pelo macrófago através do receptor de FS. Além disso, esses autores também observaram a expressão de um carboidrato, o N-acetilgalactosamina, nas promastigotas da cepa responsável pela LCL que não foi detectado na LMC, podendo estar relacionado de alguma forma com o comportamento clínico dessa doença.

1.4. *LEISHMANIA SP.*

1.4.1. Morfologia

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos unicelulares digenéticos (heteróxenos), ou seja, parasitos com alternância de evolução entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, os quais apresentam duas formas evolutivas fundamentais: amastigotas e promastigotas, cujas principais características ultraestruturais estão representadas na figura 4 (VANNIER – SANTOS et al., 2002).

As formas amastigotas são intracelulares obrigatórias com corpo celular pequeno, apresentando aproximadamente 1,5 a 3 x 3 a 6,5 µm. São formas esféricas ou ovoides e não apresentam mobilidade. Por microscopia eletrônica de transmissão (MET) é possível observar uma rede de microtúbulos subpeliculares disposta sob a membrana celular, o que confere formas celulares bem definidas durante o ciclo evolutivo deste protozoário. Na região anterior do corpo das amastigotas, a membrana apresenta uma invaginação formando a bolsa flagelar, onde se localiza um pequeno flagelo que não se exterioriza. Na matriz citoplasmática é observado o núcleo grande e arredondado, aparelho de Golgi, retículo endoplasmático, ribossomos, vacúolos, inclusões lipídicas entre outras. São as formas encontradas no interior de vacúolos das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), principalmente em macrófagos do hospedeiro mamífero (MICHALICK & RIBEIRO, 2011).

As formas promastigotas estão presentes no ciclo extracelular e possuem grande mobilidade, além do corpo celular fusiforme e alongado, com dimensões entre 10 a 40 x 1,5 a 3 µm de diâmetro que variam dependendo da espécie. Essas formas apresentam um longo flagelo livre que emerge a partir da bolsa flagelar e estruturas de membrana, núcleo e organelas citoplasmáticas que se assemelham ao da forma amastigota. São encontradas no trato digestivo do hospedeiro invertebrado (MICHALICK & RIBEIRO, 2011).

O parasito, em ambas as formas, possui uma única mitocôndria que se estende ao longo do corpo celular e que em determinada porção, próximo ao corpúsculo basal, que se apresenta como a continuação do flagelo, possui um arranjo complexo de DNA mitocondrial, denominado cinetoplasto, característico de sua ordem Kinetoplastida, com localização perpendicular à base do flagelo (SOUZA et al., 1997).

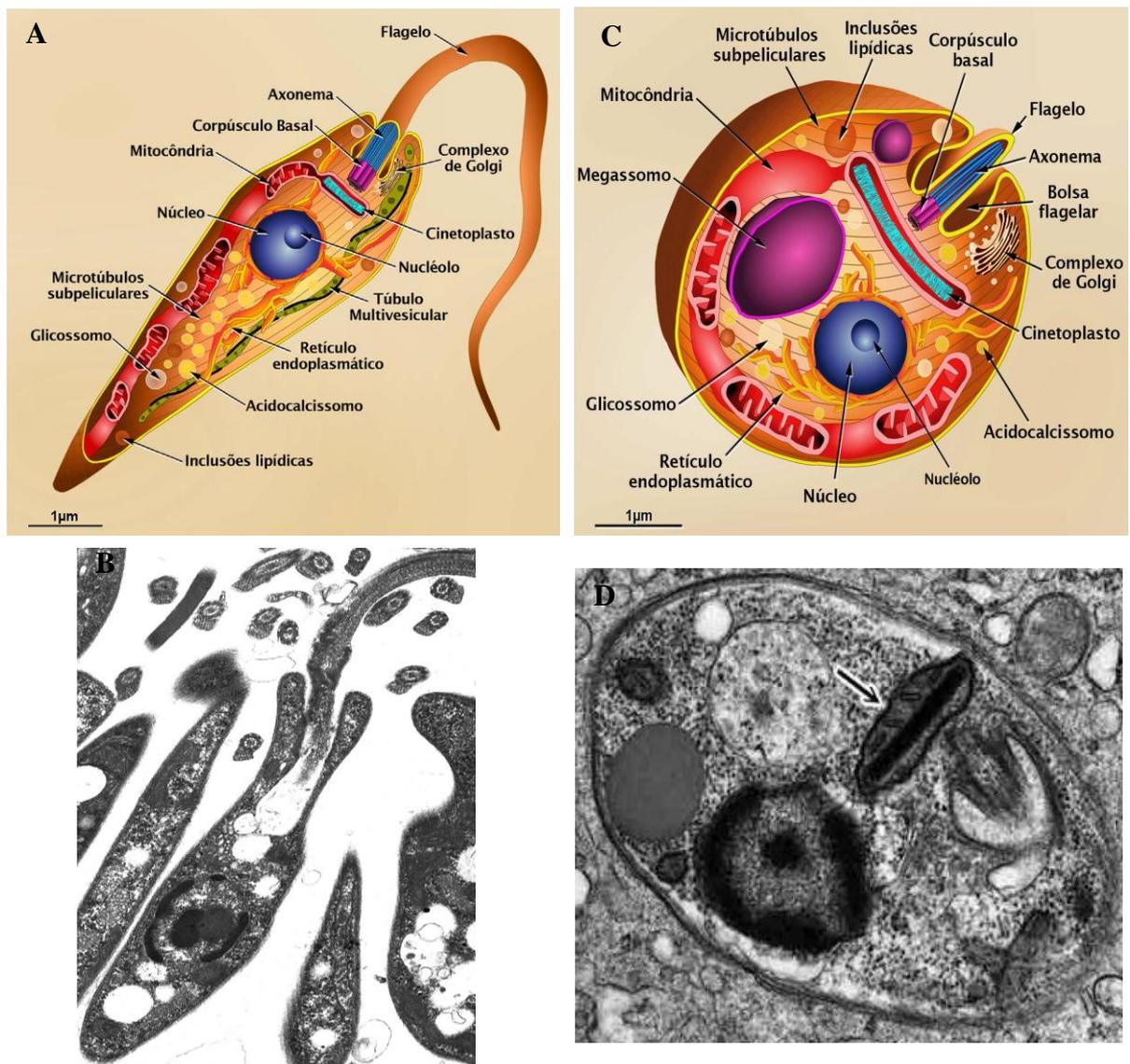


Figura 4: Principais formas evolutivas do protozoário do gênero *Leishmania* sp. Desenho esquemático das formas promastigota (A) e amastigota (C) do protozoário. Fonte: TEIXEIRA et al., 2013. (B) Forma promastigota de *L. (V.) braziliensis* por MET. Fonte: LABORATÓRIO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL, ICB/UFPA, 2007. (D) Forma amastigota de *Leishmania* spp. por MET. Observar presença do cinetoplasto (seta). Fonte: JU et al., 2004 (modificada).

1.4.2. Ciclo biológico

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

O ciclo de vida deste parasito pode se iniciar quando a fêmea do flebotomíneo, ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado, ingere formas amastigotas do protozoário que são encontradas livres na circulação ou no interior de macrófagos. Estes insetos apresentam aparelho bucal curto e rígido, adaptado para dilacerar tecidos e vasos sanguíneos, que facilita a obtenção de um conjunto de sangue, linfa e restos celulares durante a alimentação. O sangue ingerido contendo os parasitos vai para o intestino médio do inseto, onde amastigotas transformam-se em promastigotas procíclicas. Após cinco dias, aproximadamente, no intestino médio anterior do flebotomíneo os parasitos se desenvolvem em promastigotas metacíclicas, em um processo de diferenciação celular designado metaciclogênese tornando-se infectantes para o hospedeiro vertebrado. As promastigotas metacíclicas possuem os diâmetros do corpo reduzido e flagelo muito longo, cerca de duas vezes o comprimento do corpo (GRIMALDI & TESH, 1993; BATES, 2006).

As promastigotas metacíclicas migram para a probóscida do vetor e durante o hematofagismo, são inoculadas no hospedeiro vertebrado (BATES, 1994). A presença de moléculas específicas na superfície dessas promastigotas, como LPG e gp63, fazem com que estas formas resistem à ação lítica do complemento e então, são rapidamente fagocitadas por células do SFM. Neutrófilos e macrófagos são atraídos para o local da inoculação e iniciam a reação inflamatória contra os protozoários (RASMUSSEN & DESCOTEAUX, 2004; GUEIRARD et al., 2008). Após internalização e formação do vacúolo parasitóforo, as promastigotas diferenciam-se em formas amastigotas, aptas a se multiplicarem (MCCONVILLE et al., 2007; NADERER & MCCONVILLE, 2008). Estas formas multiplicam-se sucessivamente por divisão binária simples até a ruptura da célula hospedeira, sendo liberadas na circulação e infectando novas células vizinhas e novos vetores, se estiverem presentes no mesmo habitat do indivíduo infectado, mantendo o ciclo com o homem como hospedeiro e os animais, muitas vezes domésticos, como reservatórios (figura 5) (BAILEY & LOCKWOOD, 2007; SAKTHIANANDESWAREN et al., 2009).

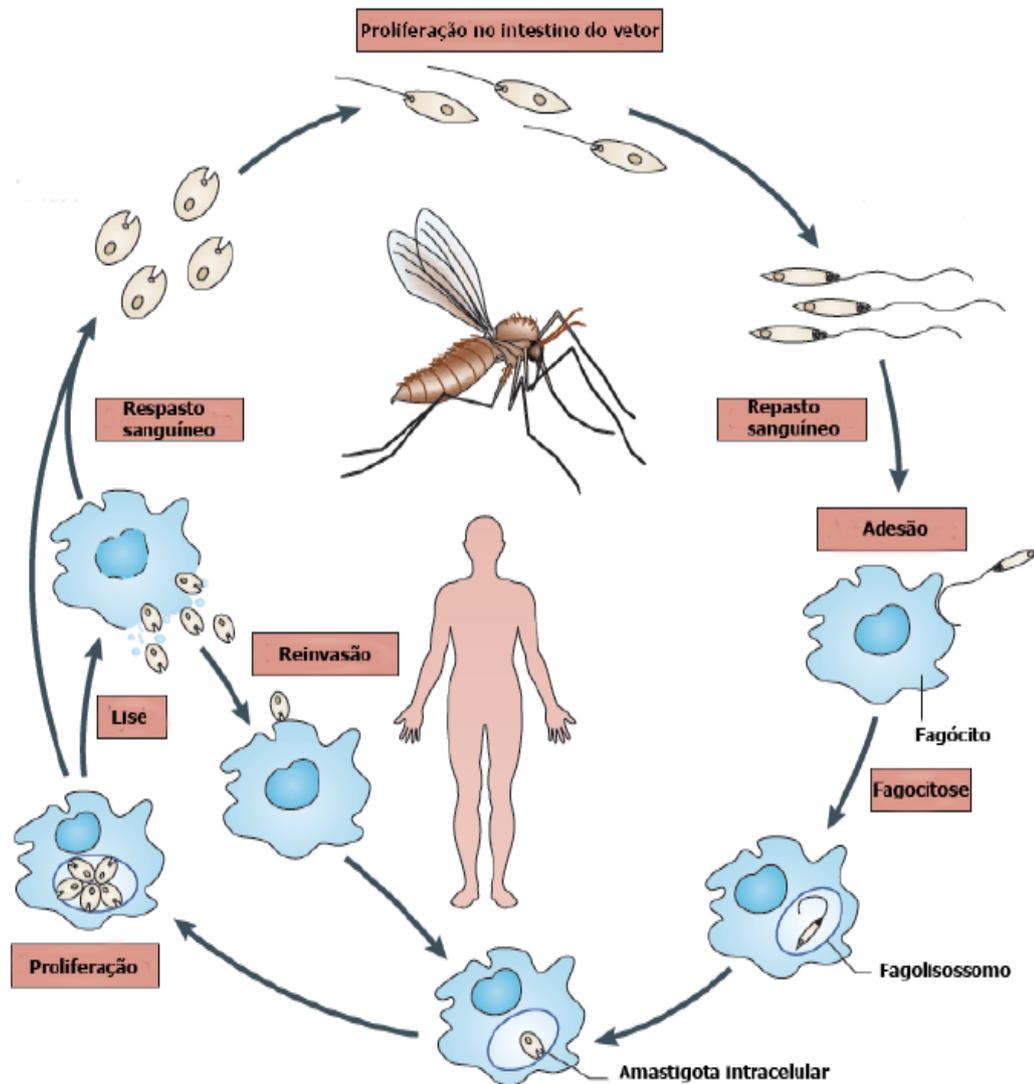


Figura 5: Ciclo de vida do parasita do gênero *Leishmania*. No intestino do vetor há proliferação de formas promastigotas procíclicas. Essas formas migram para a probóscida do flebotomíneo quando se tornam infectantes (metacíclicas) para o hospedeiro vertebrado. Durante o repasto sanguíneo, o vetor infecta o hospedeiro com promastigotas metacíclicas que são reconhecidas e fagocitadas, principalmente por macrófagos, formando no seu interior um fagolisossomo. Em seguida, há diferenciação para a forma de resistência, a amastigota intracelular, que se multiplica até a ruptura da célula, que podem invadir novos macrófagos. O vetor se infecta durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, ingerindo formas amastigotas livres na circulação ou no interior de macrófagos, que ao alcançar o intestino médio do inseto transformam-se em promastigotas procíclicas, reiniciando o ciclo. Fonte: KAYE & SCOTT, 2011 (modificada).

A maioria dos estudos *in vitro* com protozoários do gênero *Leishmania* utilizam as formas promastigotas cultivadas em meio líquido para estudos de caracterização e interação com a célula do hospedeiro vertebrado. Assim como na maioria das células em cultura, os parasitos apresentam um padrão sigmoidal de atividade proliferativa denominada curva de crescimento, a qual reflete a adaptação à cultura, as condições do ambiente, a disponibilidade de substrato físico e suprimentos de nutrientes necessários para promover o crescimento (DE ALMEIDA & BOAVENTURA, 2005).

O cultivo *in vitro* de leishmanias apresenta duas fases principais do crescimento celular, a fase logarítmica ou exponencial e a fase estacionária, que podem variar entre espécies. A primeira consiste em um período em que há aumento constante do número de organismos na cultura, com intensa atividade metabólica das células, ao passo que na segunda fase não há aumento nos níveis de crescimento celular e a atividade metabólica decresce (DE ALMEIDA & BOAVENTURA, 2005). SACKS & PERKINS (1984) mostraram que a infectividade de promastigotas de leishmania é dependente do ciclo celular e restrita à fase estacionária de crescimento *in vitro*.

No estudo de FARIAS et al. (2013) com promastigotas da espécie *L. (V.) braziliensis*, foi demonstrado que a fase logarítmica de crescimento ocorre no quarto dia de cultivo, enquanto, as fases estacionária inicial e estacionária tardia ocorrem no sétimo e décimo dia, respectivamente.

1.4.3. Principais organelas e estruturas citoplasmáticas do parasito

O protozoário do gênero *Leishmania* apresenta diversas e diferentes estruturas que estão diretamente envolvidas na sua atividade endocítica, exocítica e no seu metabolismo próprio, como nutrição, replicação, obtenção de energia e outros. Estas estruturas diferem o metabolismo deste parasito de outros tripanossomatídeos, diferenciando-se também entre os diferentes estágios de seu desenvolvimento. O processo de endocitose nesses parasitos é descrito como forma de nutrição e evasão da resposta imune celular do hospedeiro, sendo, portanto, um importante mecanismo para sobrevivência do parasito durante a infecção. As principais estruturas citoplasmáticas do parasito envolvidas nas vias endocíticas é a bolsa flagelar e o megassomo (DE SOUZA et al., 2009).

A bolsa flagelar é um local de grande atividade de excreção e pinocitose, consiste em uma pequena invaginação da membrana plasmática, na qual emerge um flagelo, participando de vários processos celulares. Esta estrutura complexa pode ser facilmente observada por MET, mostrando uma complexa organização e preciso posicionamento em relação aos elementos do citoesqueleto e organelas. Próximo à bolsa flagelar, macromoléculas se aderem e são rapidamente internalizadas, dando origem a pequenas vesículas endocíticas, que brotam destas estruturas. Nas formas amastigotas de leishmania, a degradação do material ingerido ocorre no megassomo, uma organela presente somente nessas formas parasitárias. Quando vistas por MET, apresentam-se como organelas eletrodensas, delimitadas por membrana que variam de forma e tamanho, podendo alcançar o diâmetro do núcleo da célula. A matriz dessa organela não é homogênea, apresentando densas inclusões e vesículas, é conhecida por apresentar características lisossômicas e está relacionada com a infectividade do parasito (DE SOUZA, 2002; DE SOUZA et al., 2009).

Em protozoários parasitos há diferentes organelas intracelulares, que estão envolvidas na regulação da homeostase de íons, como por exemplo, o retículo endoplasmático, mitocôndrias e acidocalcissomo. O acidocalcissomo é uma organela ausente no metabolismo das células de mamíferos, apresenta caráter ácido e elevada eletrodensidade. Esta organela armazena cálcio, é rico em pirofosfato, magnésio, sódio, potássio, e em alguns casos zinco, além de uma baixa concentração de cloro e enxofre. Possui várias funções, dentre elas o estoque de cálcio e fósforo, homeostase de cálcio, manutenção do equilíbrio do pH intracelular e osmorregulação, realizados devido a presença de bombas (Ca^{2+} -ATPase, V-H^{+} -ATPase, H^{+} -PPase), transportadores ($\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$, $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$), e canais (aquaporinas) na sua membrana (DOCAMPO & MORENO, 2001; MIRANDA et al., 2008).

A diferença entre as formas de leishmania e outros tripanossomatídeos refere-se, principalmente, ao metabolismo de carboidratos, como a manose (reserva energética) e aminoácidos. Aminoácidos e açúcares podem ser utilizados como fontes de energia, a partir do metabolismo de glicossomos e mitocôndrias, que contém uma ativa cadeia de transporte de elétrons. Glicossomos são estruturas delimitadas por membrana, onde há metabolização e degradação de açúcares. Sua presença é abundante em amastigotas, porém pouco se sabe a cerca do funcionamento desta organela, mas que há uma variabilidade na presença de enzimas dependendo do estágio de diferenciação do parasito (MOTTRAM & COOMBS, 1985).

1.5. CORPOS LIPÍDICOS

Corpos lipídicos (CLs) são inclusões intracelulares citoplasmáticas de compartimentalização e estocagem de lipídios. São organelas heterogêneas presentes em diversos organismos, apresentam diferentes tamanhos e composição. Na literatura, são conhecidos por diferentes termos como “*lipid droplets*”, “*lipid bodies*”, “*lipid globules*” ou “*adiposomes*” (MURPHY, 2001; MARTIN & PARTON, 2006).

Por muitos anos, os CLs foram considerados sítios de reserva metabólica com pouca relevância funcional. Sua presença foi associada principalmente a tecidos que possuíam função de acúmulo ou transporte lipídico em animais e plantas, como é o caso do tecido adiposo e fígado em mamíferos, e em sementes e frutos de plantas. Por outro lado, em microrganismos como leveduras, microalgas e bactérias, o acúmulo de CLs parece ser induzido especificamente em resposta a um estresse ambiental, como limitação de nitrogênio ou estresse osmótico (MURPHY, 2001; FARESE & WALTHER, 2009).

Com o advento de novas técnicas, os CLs foram encontrados em vários tipos celulares e atualmente são classificados como organelas dinamicamente ativas. Além disso, são considerados a segunda principal forma de composição macromolecular de lipídios associado com sistemas biológicos, depois das bicamadas lipídicas que formam a matriz de todas as membranas celulares (MURPHY, 2001).

A estrutura e morfologia dos CLs são bem descritos em células de mamíferos, principalmente em adipócitos. Estudos mostraram que são constituídos por uma monocamada de fosfolipídios (FL), glicolipídios anfipáticos e/ou esteróides que circundam um núcleo hidrofóbico de lipídios neutros, tais como triacilgliceróis (TG) e ésteres de esteróis, principalmente (figura 6B). A composição dos lipídios neutros nos CLs pode variar dependendo da célula ou do microrganismo que se encontram, por exemplo, as leveduras apresentam 50% de TG e 50% de ésteres de esteróis, enquanto que nos adipócitos há primariamente TG. Podem se expandir em número e tamanho no citoplasma celular quando há excesso de lipídios, na tentativa de prevenir a lipotoxicidade das células. (MURPHY, 2001; WALTHER & FARESE JR., 2009; SAKA & VALDIVIA, 2012).

A síntese dos lipídios neutros, presente no núcleo dos CLs, é catalisada por uma variedade de enzimas. Células de mamíferos, por exemplo, possuem a enzima acilcoenzima A (Acil-CoA):diacilglicerol aciltransferase (DGAT) – DGAT1 e DGAT2 – para síntese de TG, e Acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT) – ACAT1 e ACAT2 – para síntese de ésteres de esteróis. Todas essas enzimas estão presentes principalmente no retículo endoplasmático, com

exceção da enzima DGAT2 que também está presente nos CLs (WALTHER & FARESE JR., 2012).

GREENBERG et al. (1991), encontraram na superfície dos CLs de adipócitos uma fosfoproteína, a perilipina, com função especializada no armazenamento de lipídios. Essas organelas apresentam várias proteínas específicas ligadas à sua superfície que participam da geração, maturação, degradação, tráfego e mobilização de CLs nas células (MURPHY, 2001). As principais proteínas são: Perilipina ou PLIN1; ADRP (Proteína Relacionada à Diferenciação de Adipócitos), Adipofilina ou PLIN2; e TIP47 (Proteína de Interação de Cauda de 47 kDa) ou PLIN3. Perilipina e ADRP parecem desempenhar papel na montagem e formação dos CLs (LONDOS et al., 2005; HERKER & OTT, 2012) e TIP47 desempenha um importante papel na biogênese dessa organela (SAKA & VALDIVIA, 2012).

Essas proteínas reunidas compõem a família de proteínas PAT e apresentam um domínio N-terminal comum com cerca de 100 aminoácidos, denominado domínio PAT, que não está totalmente caracterizado funcionalmente (BELLER et al., 2010; HERKER & OTT, 2012). Outras duas proteínas, S3-12 e OXPAT, também fazem parte deste grupo, além de algumas lipases e enzimas metabólicas, como GTPases da família Rab, consideradas reguladoras do tráfego vesicular e da interação entre organelas (BICKEL et al., 2009; MELO et al., 2011). Os membros da família de proteínas PAT diferenciam-se pelo tamanho, expressão tissular, afinidade por CLs, estabilidade quando não ligadas aos CL e regulação da transcrição (BICKEL et al., 2009).

Estudos mais recentes mostraram que os CLs podem interagir com outras organelas das células em que se encontram (figura 6A) (JÄGERSTRÖM et al., 2009; MURPHY et al., 2009; BELLER et al., 2010). Segundo HERKER & OTT (2012), mitocôndrias são sempre encontradas bem próximas aos CLs com conexão entre as suas membranas que devem facilitar o efluxo de ácidos graxos livres (AG) para reações de β -oxidação, importante para o processo de produção de energia. Além disso, já foram descritas associações com cisternas de retículo endoplasmático liso (RE) que parece estar relacionado com a biogênese dos CLs (MARTIN & PARDON, 2005).

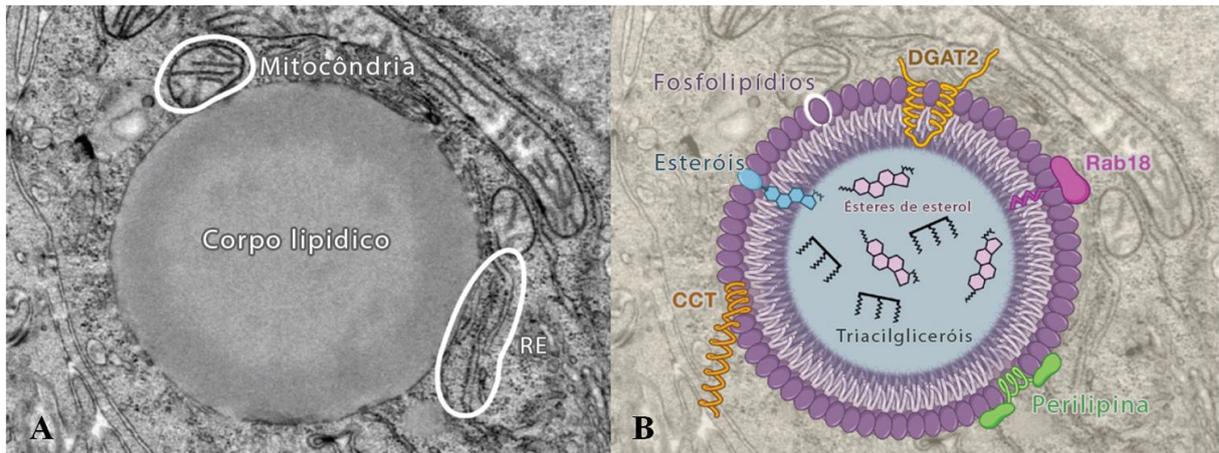


Figura 6: Estrutura de um corpo lipídico por Microscopia Eletrônica de Transmissão. (A) Corpo lipídico de uma célula de hepatoma, mostrando a monocamada lipídica circundante e uma estreita associação entre a membrana da mitocôndria e do retículo endoplasmático. (B) Características estruturais de um corpo lipídico mostrando lipídios polares na monocamada de superfície, como fosfolipídios e esteróis, lipídios apolares do núcleo, como ésteres de esterol e triacilgliceróis e uma variedade de proteínas de superfície, como perilipina, Rab18, DGAT2 e CCT (CTP-fosfocolina-citidil-transferase). Fonte: FARESE & WALTHER, 2009 (modificada).

1.5.1. Corpos lipídicos e células de mamíferos

Além dos adipócitos, os CLs estão presentes em uma variedade de células de mamíferos. Nos hepatócitos, por exemplo, CLs estão presentes e armazenam grandes quantidades de TG e ésteres de colesterol, que fornecem cerca 70% de substrato para a síntese de proteínas de densidade muito baixa (VLDL) (LEHNER et al., 1999). Também foram encontrados em células estelares do fígado ou células de Ito, capazes de armazenar retinóides (vitamina A e seus metabólitos) sob a forma de ésteres de retinol (BLANER et al., 2009). Células epiteliais secretoras da glândula mamária também apresentam CLs que contribuem para a composição nutricional do leite materno (HEID & KEENAN, 2005).

Quanto à função, os CLs nas células em que se encontram, podem estar envolvidos no metabolismo de lipídico (MARTIN & PARTON, 2005), tráfego celular (LIU et al., 2004), transmissão e regulação da sinalização (BICKEL et al., 2009), além de participarem da resposta imune (BOZZA et al., 2007, 2009). DVORAK et al. (1983) mostraram que durante o processo de fagocitose de macrófagos, CLs tendem a se associar e descarregar seu conteúdo nos fagolisossomos, sugerindo que possam ter um papel ativo importante para os macrófagos.

Atualmente, os CLs são considerados como organelas naturalmente encontradas em células envolvidas com o processo inflamatório, principalmente macrófagos e leucócitos, e estão presentes em grande número quando há estímulos inflamatórios. São considerados

sítios de produção de mediadores inflamatórios (eicosanóides) e marcadores estruturais do processo inflamatório, pois contém no seu interior ácido araquidônico (AA), um ácido graxo esterificado precursor da síntese de eicosanóides e de todas as enzimas necessárias para essa síntese, como cicloxigenases (COX), prostaglandina E₂ (PGE₂) sintetase, 5- e 15-lipoxigenases (5-LO e 15-LO) e leucotrieno C₄ (LTC₄) sintetase, que já foram localizadas em células ativadas (MELO et al., 2011).

1.5.2. Corpos lipídicos e patógenos

A presença e função de CLs em diferentes tipos celulares de mamíferos são bem descritas. Porém, ainda é pouco conhecido sua participação durante o processo de interação com patógenos e, principalmente, a presença e função de CLs em patógenos. Recentemente, foi identificado que uma variedade de agentes patogênicos, como vírus, bactérias intracelulares e protozoários, utiliza CLs do hospedeiro como fonte de precursores lipídicos (SAKA & VALDIVIA, 2012).

MELO et al. (2003) demonstraram pela primeira vez que o aumento da produção de CLs por células inflamatórias de mamíferos pode ser induzido por patógenos. Ao analisarem a fase inicial de infecção *in vivo* por *Trypanosoma cruzi*, foi observado que há indução da formação de CLs em macrófagos peritoneais de ratos, com síntese aumentada de PGE₂, confirmando ainda que essas organelas possam ter função no aumento da produção de eicosanóides durante a infecção.

Desde então, a formação de CLs pelas células do hospedeiro e sua associação com outros patógenos tem sido alvo de diversas investigações. Um estudo realizado com *Chlamydia trachomatis* caracterizou a interação de CLs da célula hospedeiro com o vacúolo parasitóforo, denominado de “inclusão” (COCCHIARO et al., 2008). CLs citoplasmáticos do hospedeiro são translocados pela membrana da inclusão em direção ao lúmen. Esse sequestro de organela do hospedeiro leva a uma subversão da resposta imunológica inata pelo patógeno, com obtenção direta de nutrientes.

PINHEIRO et al., 2009, ao avaliarem a importância do processo de autofagia em macrófagos infectados por *L. amazonensis*, observaram que a indução do processo levou a um aumento da carga parasitária, com consequente aumento de CLs e PGE₂. Durante o estudo foi observado que só a infecção pelo protozoário induz um aumento na produção de CLs nos macrófagos, e que a produção de PGE₂ é um fator de susceptibilidade à infecção por *L.*

amazonensis em macrófagos de BALB/c. Entretanto, poucos trabalhos relatam a presença de CLs em patógenos e sua importância durante o processo de interação com a célula hospedeira.

Um estudo *in vitro* com a bactéria *Mycobacterium smegmatis* mostrou a presença de CLs contendo triglicerídeos como principal componente, com funções de armazenamento e constituindo o envelope celular. O mesmo estudo mostrou que a espécie *Mycobacterium tuberculosis* presente em secreções pulmonares de pacientes com tuberculose, apresentam CLs que podem refletir um estado metabólico importante para a infecção no hospedeiro, uma vez que não foi possível observar *in vitro* (GARTON et al., 2002). Desta forma, os autores sugerem que os CLs são organelas importantes para a patogenicidade da bactéria *in vivo*, sendo, portanto, um potente alvo para tratamento de tuberculose, pois nessas estruturas há armazenamento de lipídios sequestrados do hospedeiro que podem ser importantes para sua sobrevivência durante o estágio não proliferativo.

CHARRON & SIBLEY (2002) ao analisar lipídios em *Toxoplasma gondii*, durante o processo de replicação dentro da célula hospedeira, observaram que o parasito é capaz de mobilizar e selecionar lipídios neutros de vários compartimentos celulares do hospedeiro. Os lipídios selecionados são armazenados como reserva em CLs e são importantes para a formação de lipídios mais complexos no parasito. Esses CLs estavam associados com retículo endoplasmático e aparelho de Golgi, e parecem atuar como organelas que participam da homeostase lipídica e fonte para a biogênese de membrana durante crescimento e replicação do parasito na célula hospedeira.

Posteriormente, JACKSON et al. (2004) ao estudarem CLs em *Plasmodium falciparum*, protozoário causador da malária, demonstraram que durante o seu ciclo eritrocítico há formação de CLs que estão associados com o vacúolo digestivo do parasito, local de degradação de hemoglobina. Os autores sugerem que os lipídios neutros presente nos CLs podem ser importantes no processo de detoxificação de monômeros ou dímeros de ferriprotoporfirina IX (grupo heme), além de atuarem como organelas de reserva para blocos de construção de lipídios para formação da membrana fosfolipídica durante o processo de reprodução. Estas estruturas lipídicas parecem ser importantes para a patogênese da doença no homem e parecem ser possíveis alvos para o tratamento malárico.

RAMOS et al. (2009) demonstraram a presença de CLs distribuídos no citoplasma do protozoário da espécie *L. (V.) shawi* em diferentes fases do crescimento. Nesse estudo foi observado um acúmulo de CLs no parasito durante a fase estacionária, sugerindo que esse acúmulo é essencial para multiplicação e interação do parasito com a célula hospedeira. Porém, sua importância para a infectividade do parasito ainda não está esclarecida.

Desta forma, estes estudos demonstram que infecções por patógenos intracelulares induzem a formação de novos CLs ou o aumento do seu diâmetro no hospedeiro, e conseqüentemente aumento da produção de PGE₂, que favorece a célula hospedeira infectada. Porém, também deixa evidente que os patógenos são capazes de obter precursores lipídicos do meio em que se encontram, seja *in vitro* ou *in vivo*, para utilizá-los como fonte de energia ou na síntese da membrana lipídica durante as fases de replicação ativa ou reprodução (WENK, 2006). Patógenos intracelulares podem utilizar os CLs para benefício próprio ou induzir sua formação na célula hospedeira como sinalização de um estado infeccioso, levando à sua destruição (figura 7). Quanto à espécie *L. (V.) braziliensis*, não há estudos na literatura que comprovem de que maneira o protozoário pode utilizar os CLs da célula hospedeira, nem como tais estruturas podem ser importantes para o metabolismo do próprio parasito.

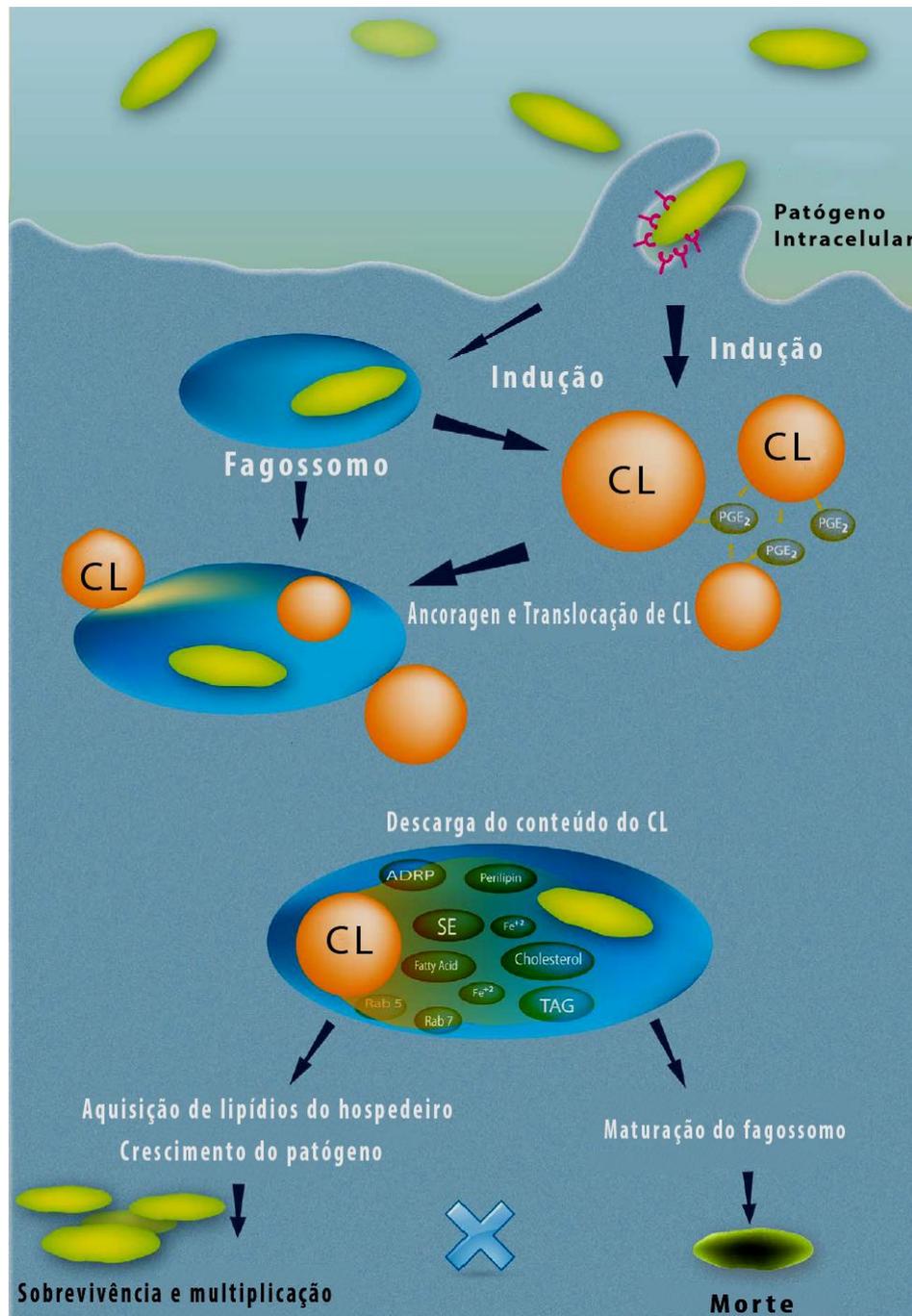


Figura 7: Representação esquemática da formação de CLs mediada por patógenos intracelulares, translocação de CLs para fagossomos e possíveis consequências da interação de CLs e patógenos. Fonte: MELO & DVORAK, 2012 (modificada).

2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são zoonoses consideradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das seis principais endemias, infectando cerca de dois milhões de pessoas no mundo. A LTA continua sendo um problema de saúde relevante no Brasil. No ano 2010, as regiões Sudeste e Nordeste apresentaram um índice elevado de novos casos registrados, aumentando em aproximadamente 34% e 23%, respectivamente (BRASIL, 2011). O perfil da doença no país está mudando, de uma zoonose transmitida acidentalmente ao homem, para uma doença de interface rural-urbana devido à expansão humana para áreas endêmicas florestais (CHAGAS et al., 2006). Na região Norte a grande incidência dos casos vêm ocorrendo devido ao processo de exploração predatória e desmatamento da Amazônia, facilitando a disseminação do vetor da doença.

Mesmo diante da grande distribuição mundial, o tratamento das leishmanioses ainda é limitado devido a fatores como: reações adversas dos pacientes às drogas utilizadas, resistência ao tratamento adquirida pelos parasitos com o passar dos anos, diversidade de espécies patogênicas ao homem e resposta imunológica de cada indivíduo. Por estes motivos, é preponderante a identificação de novos alvos terapêuticos que atinjam vias metabólicas específicas e que sejam diferentes do hospedeiro vertebrado, que sejam fundamentais para sua infectividade, na tentativa de obter novos métodos alternativos para tratamento.

Devido à existência de uma multiplicidade de cepas causadoras da LTA (cutânea e mucocutânea) por *L. (V.) braziliensis*, uma das principais espécies causadoras da doença no estado do Pará, torna-se importante à busca do conhecimento de aspectos básicos do metabolismo desse parasito, como o metabolismo lipídico dessas espécies, na tentativa de caracterizar componentes fundamentais para seu desenvolvimento e sobrevivência no hospedeiro vertebrado. Estes dados são fundamentais para a identificação futura de possíveis alvos para intervenção de drogas terapêuticas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a distribuição de corpos lipídicos e o perfil de lipídios totais presentes em cepas de *L. (V.) braziliensis* obtidas de diferentes casos clínicos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e quantificar a distribuição de corpos lipídicos nas cepas que causam LCL e LMC da espécie *L. (V.) braziliensis*, nas fases estacionária inicial e tardia;
- Analisar a composição lipídica total das diferentes cepas que causam LCL e LMC da espécie *L. (V.) braziliensis* obtidas nas fases estacionária inicial e tardia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CULTIVO E MANUTENÇÃO DO PARASITO

No presente trabalho foram utilizadas cepas da espécie *L. (V.) braziliensis* responsável pela LMC (MHOM/BR/M17323) e pela LCL (MHOM/BR/M17593) provenientes do Programa de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas. As formas promastigotas foram obtidas em meio NNN e mantidas em meio RPMI 1640, suplementadas com Soro Bovino Fetal (SBF) a 20% e GPPS a 1% (Glutamina 0,2 M; Ácido pirúvico 0,0125 M; Penicilina/Estreptomicina 5 mM) em estufa B. O. D. (Biochemical Oxygen Demand) Quimis[®] à 27 °C. Para todos os experimentos realizados, foram utilizadas promastigotas das diferentes cepas nas fases estacionária inicial (EST-I), que corresponde ao 7º dia do crescimento celular e tardia (EST-T) que corresponde ao 10º dia do crescimento celular.

4.2. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DO PARASITO

Para análise ultraestrutural, os protozoários foram lavados em PBS pH 7.2 e fixados em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído tipo II (70%), 4% de paraformaldeído e 2,5% de sacarose, em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes em tampão cacodilato 0.1 M e posteriormente incubadas em solução contendo: tetróxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio 0,8% por 30 minutos, à temperatura ambiente. As células foram lavadas três vezes em tampão cacodilato 0.1 M, durante dez minutos cada, e então desidratadas em 50%, 70%, 90% e três vezes em 100%, por dez minutos cada série crescente de acetona durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após a desidratação, as células foram lentamente infiltradas em resina Epon[®] nas seguintes concentrações: 2:1, 1:1 e 1:2 (acetona 100%: Epon[®] - 12 horas em cada etapa). A seguir o material foi incluído em Epon[®] puro por 6 horas e depois em suporte para polimerização à 60 °C por 48 horas. Os blocos polimerizados foram cortados em ultramicrótomo (Leica EM UC6) e as amostras presentes nos cortes foram contrastadas durante 20 minutos com acetato de uranila 5% e, posteriormente, durante cinco minutos com citrato de chumbo e observados por microscopia eletrônica de transmissão (MET) LEO 906 E.

4.3. IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS DO PARASITO

4.3.1. Citoquímica pelo método ósmio-imidazol

Os parasitos foram obtidos de cultura como descrito no item 4.1, lavados em PBS pH 7.2 e fixados como descrito no item 4.2. Após a fixação, as células foram lavadas uma vez em tampão cacodilato 0.1 M, pH 7.2 e uma vez em tampão imidazol 0.1 M, pH 7.5. Posteriormente, foi realizada a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2% em tampão imidazol 0.1 M, por 30 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. O complexo ósmio-imidazol formado possui alta afinidade por ligações duplas, interagindo facilmente com moléculas de ácidos graxos insaturados (SOARES, 2007). Foi realizada duas lavagens em tampão imidazol 0.1 M, e então desidratadas em 50%, 70%, 90% e três vezes em 100%, cada série crescente de acetona durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após a desidratação, as células foram lentamente infiltradas em resina Epon® nas seguintes concentrações: 2:1, 1:1 e 1:2 (acetona 100%: Epon® - 12 horas em cada etapa). A seguir o material foi incluído em Epon® puro por 6 horas e depois em suporte para polimerização a 60 °C por 48 horas. Os blocos polimerizados foram cortados em ultramicrotomo (Leica EM UC6) e os cortes ultrafinos obtidos foram observados por MET LEO 906 E, sem prévia contrastação, ou contrastados em apenas 1 minuto com citrato de chumbo (ANGERMÜLLER & FAHIMI, 1982).

4.3.2. Quantificação de CLs por citometria de fluxo utilizando Bodipy® 493/503

O Bodipy® 493/503 é um fluoróforo lipofílico utilizado para identificação de lipídios neutros (lipídios de reserva) presentes em grandes quantidades em CLs intracelulares, e é mais específico para análise dessas estruturas por citometria de fluxo (GOCZE & FREEMAN, 1994). Para quantificação de CLs de cada amostra, promastigotas foram obtidas da cultura e lavadas em PBS, pH 7.2. 2×10^6 parasitos foram utilizados e incubados com Bodipy® 493/503 (Molecular Probes Invitrogen®) na concentração de 10 µg/ml em PBS, por 20 minutos, protegido da luz. Após a incubação, foi realizada lavagem em PBS, seguida de leitura em citômetro de fluxo BD FACSCanto II. Para confirmar a viabilidade dos protozoários, independentemente, cada amostra foi incubada por 15 minutos com Iodeto de Propídio (IP) na concentração de 10 µg/mL. O IP é um composto que se liga às cadeias de DNA, mas não consegue atravessar uma membrana citoplasmática viável, portanto, é

incorporado apenas por células mortas. Após a incubação, foi realizada lavagem das células em PBS e leitura em citômetro de fluxo. A análise dos dados obtidos foi realizada com o programa WinMDI 2.9. Os dados da média de intensidade de fluorescência foram analisados estatisticamente.

4.4. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA POR HPTLC DOS PARASITOS

Os parasitos foram obtidos de cultura como descrito no item 4.1. Após lavagem em PBS e contagem em câmara de Neubauer, 2×10^6 de parasitos de cada amostra foram fixados em 1 mL de metanol absoluto e armazenados à -20°C . No Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ, os parasitos fixados foram submetidos à extração de lipídios totais utilizando metanol:clorofórmio:água destilada (2:1:0,8 v/v) por 1 hora, como descrito por BLIGH & DYER (1959). As amostras foram submetidas à centrifugação por 20 minutos, a 3000 rpm. O sobrenadante, contendo ainda lipídios, foi separado e nele foi adicionado água destilada:clorofórmio (1:1). Após agitação por 20 segundos, o material foi centrifugado por 30 minutos, a 3000 rpm. A fase lipídica foi separada e o solvente evaporado por fluxo de N_2 . Os lipídios extraídos de cada amostra foram dissolvidos em clorofórmio e foi aplicado em placas de sílica para cromatografia em camada delgada de alta resolução (HPTLC – *high performance thin layer chromatography*) para lipídios neutros. Em uma câmara de eluição de vidro, a placa contendo os lipídios aplicados foi submetida a duas etapas de corrida para lipídios neutros, a primeira foi utilizado o conjunto de solventes n-hexano:éter dietílico:ácido acético (60:40:1) até metade da placa, e a segunda com n-hexano:clorofórmio:ácido acético (80:20:1). Após secagem, as placas foram reveladas com vapor de iodo e digitalizadas para a análise densitométrica. Os dados obtidos a partir da densitometria foram analisados estatisticamente.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios foram realizados em triplicata e a análise estatística dos dados obtidos por HPTLC e pela intensidade média de fluorescência por citometria de fluxo foi realizada com o programa GraphPad Prism Versão 5.0, utilizando a análise de variância (ANOVA) ou teste-t de Student, com nível de significância $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DO PARASITO

A análise ultraestrutural por MET de promastigotas de ambas as cepas de *L. (V.) braziliensis*, nas fases EST-I e EST-T, permitiu identificar a morfologia típica do parasito e suas estruturas fundamentais de sobrevivência e metabolismo. Foi possível observar núcleo bem definido, cinetoplasto próximo à bolsa flagelar, de onde emerge o flagelo livre.

Nas promastigotas da cepa responsável pela LCL (figura 8A e 8B) e LMC (figura 8C e 8D), durante as fases EST-I e EST-T, além da visualização das estruturas básicas para o parasito, também foi observado estruturas semelhantes à CLs, que aparecem como estruturas circulares, com matriz homogênea, geralmente eletrolucente e não são limitadas por uma unidade de membrana (SOARES, 2007).

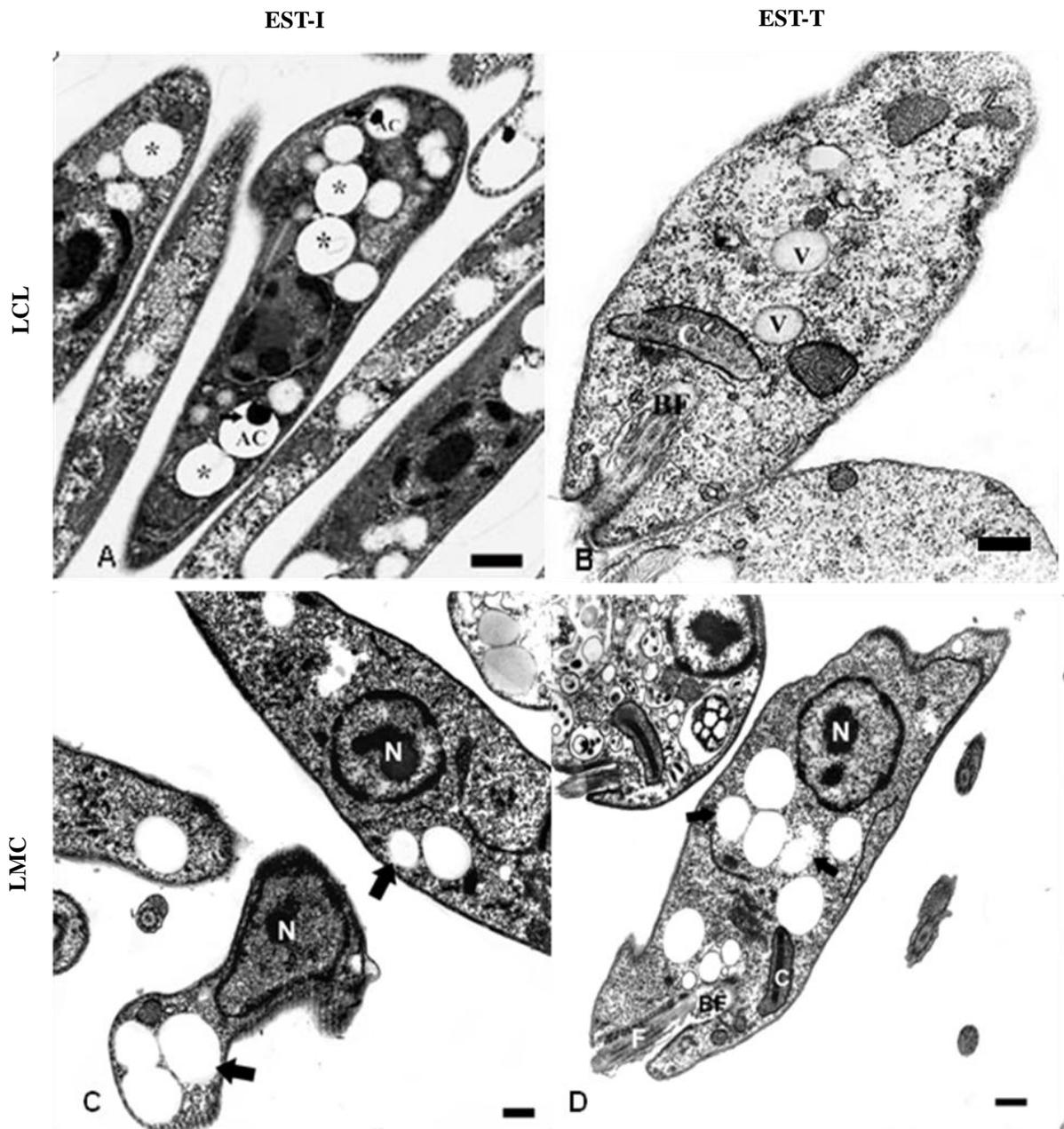


Figura 8: Forma promastigota das cepas de *L. (V) braziliensis* em diferentes fases do crescimento *in vitro* por MET. Observar na cepa responsável pela LCL na fase EST-I (A) presença de estruturas características de CLs (*) e acidocalcissomo (AC), com material elétron denso no seu interior (seta); Durante a fase EST-T (B) houve aparentemente pouca presença de CLs. Notar na cepa responsável pela LMC na fase EST-I (C) estruturas semelhantes à CLs (setas); e na fase EST-T (D), tais estruturas (setas) presente, aparentemente, em maior quantidade. N: núcleo; C: cinetoplasto; BF: bolsa flagelar; F: flagelo; V: vacúolos. Barras: (A-D): 1 μ m.

5.2. IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS DO PARASITO

5.2.1. Citoquímica pelo método ósmio-imidazol

A análise citoquímica para detecção de CLs por MET de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, permitiu confirmar a presença de corpos lipídicos no protozoário como estruturas circulares, com material eletrodense, distribuídas no citoplasma do parasito. Foi possível observar a presença dessas organelas nas promastigotas da cepa LCL nas fases EST-I (figura 9A) e EST-T (figura 9B) e nos parasitos da cepa LMC na fase EST-I (figura 9C) e EST-T (figura 9D).

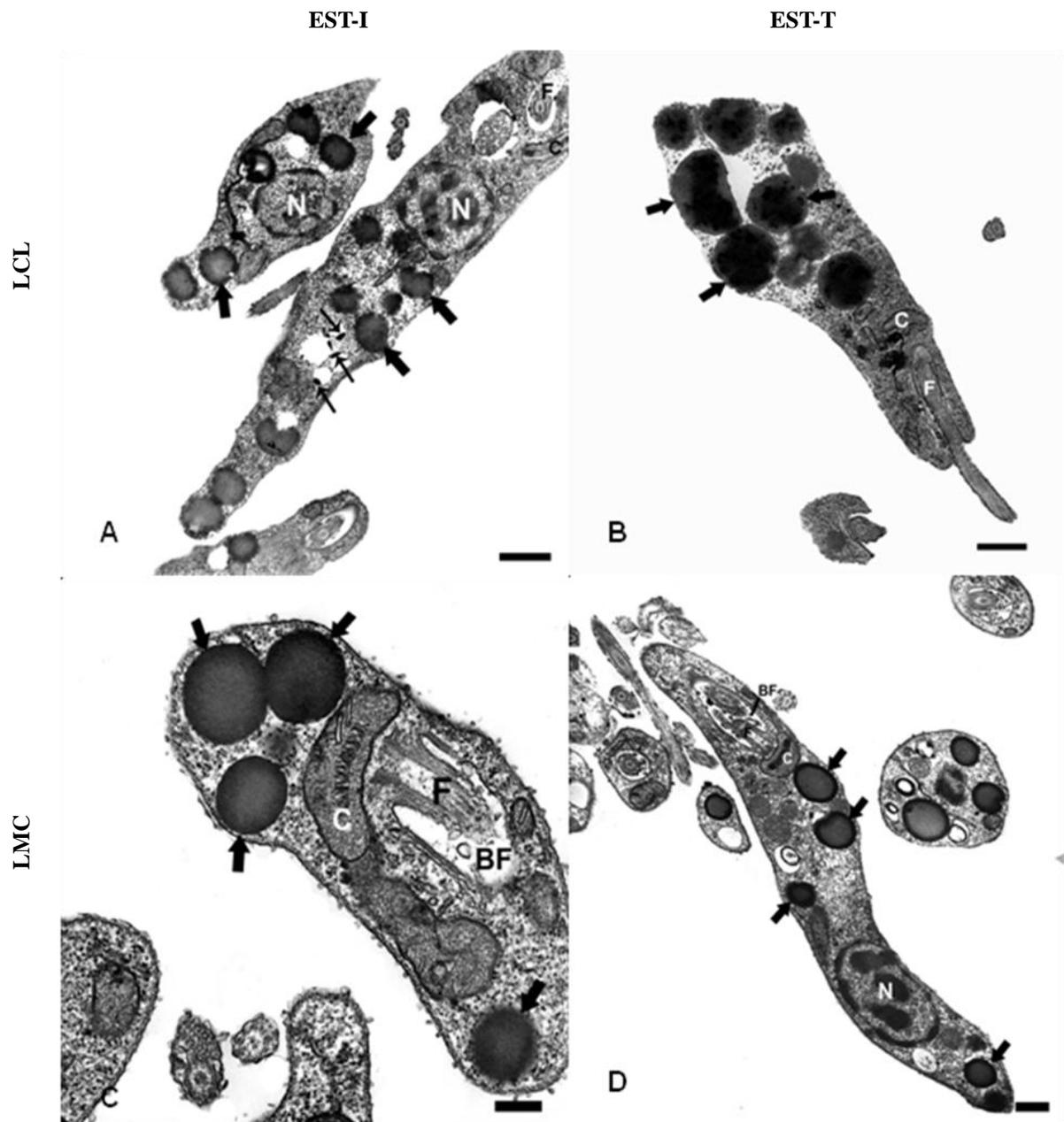


Figura 9: Identificação citoquímica ultraestrutural de CLs pelo método ósmio-imidazol em parasitos das cepas de *L. (V.) braziliensis* em diferentes fases do crescimento *in vitro*. Observar nas promastigotas de LCL na fase EST-I (A), a presença de CLs, como estruturas elétrondensas distribuídas por todo o protozoário (setas grandes), e ainda, estruturas semelhantes à acidocalcisomo (setas finas), assim como na fase EST-T (B). (C) Nas promastigotas de LMC na fase EST-I (C), notar presença de CLs distribuídos no citoplasma da célula (setas), assim como nas promastigotas da fase EST-T (D). N: núcleo; C: cinetoplasto; BF: bolsa flagelar; F: flagelo. Barras: (A) 1 μ m; (B-D) 2 μ m.

5.2.2. Quantificação de CLs por citometria de fluxo

Para quantificar a produção de CLs nos parasitos estudados foi realizada a técnica de citometria de fluxo, pela qual foi possível observar que durante a fase EST-I, promastigotas de *L. (V.) braziliensis* da cepa LCL e LMC obtiveram, respectivamente, 98,75% e 97,42% de detecção de células contendo CLs (figura 10A). Parasitos da fase EST-T do crescimento da cepa LCL e LMC obtiveram 93,33% e 99,84% de detecção de células contendo CLs, respectivamente (figura 10B). Contudo, a partir da análise da intensidade média de fluorescência, foi observado que parasito da cepa LMC da fase EST-T tiveram significativamente a maior média de intensidade de fluorescência quando comparado com a fase EST-I e com parasitos da cepa LCL, em ambas as fases do crescimento. Entre as fases do crescimento estudadas nos parasitos da cepa LCL, não foi observada variações significativas na intensidade média de fluorescência (figura 11). Isto nos indica que há maior detecção de CLs nos parasitos da cepa LMC durante a fase EST-T do crescimento.

Para confirmar a viabilidade das células, os parasitos das diferentes cepas foram incubados com IP independentemente, mostrando-se viáveis em ambas as fases do crescimento, sem emissão significativa de fluorescência vermelha pelo IP, com viabilidade maior que 87% (figura 10C e 10D).

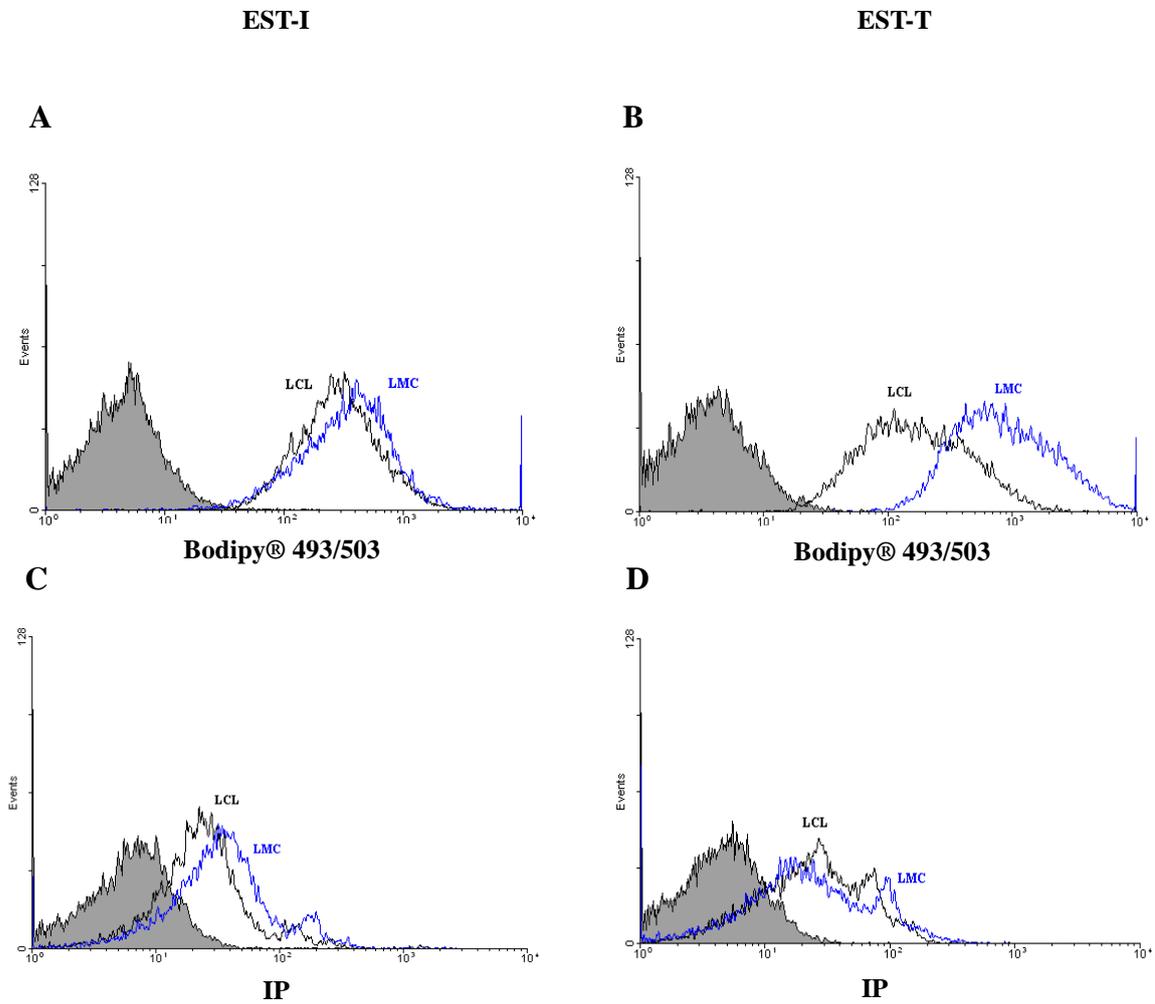


Figura 10: Histogramas representando a captação de Bodipy® 493/503 e IP pelos parasitos das cepas de *L. (V) braziliensis* nas diferentes fases do crescimento *in vitro*. (A) Promastigotas das cepas LCL (linha preta) e LMC (linha azul) na fase EST-I do crescimento marcadas com Bodipy® 493/503 sem diferença de captação entre as cepas, e controle sem marcação (histograma cinza). (B) Promastigotas das cepas LCL e LMC na fase EST-T marcadas com Bodipy® 493/503, com grande captação do fluoróforo por parasitos da cepa LMC, que indica maior quantidade de CLs distribuídos no seu citoplasma. Os parasitos de ambas as cepas, nas fases EST-I (C) e EST-T (D) se mostraram viáveis, pois não houve emissão significativa da fluorescência vermelha pelo IP, sendo a porcentagem de detecção de 7,57% para LCL EST-I, 12,14% para LMC EST-I, 5,05% para LCL EST-T e 9,57% para LMC EST-T.

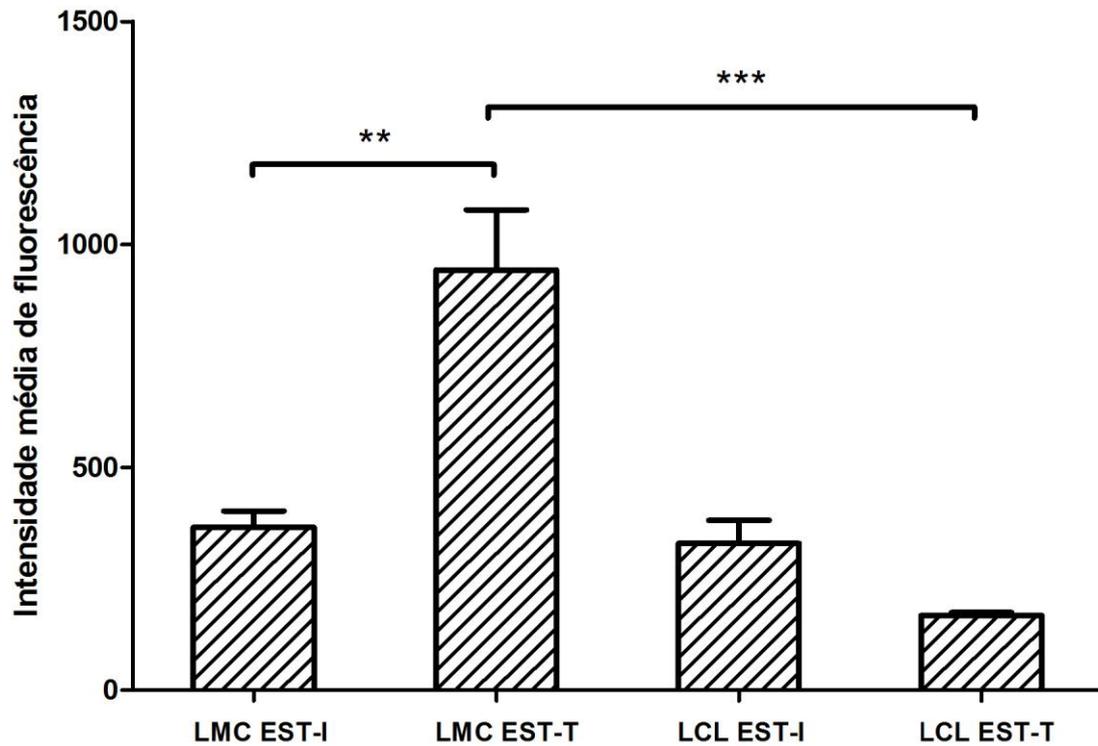


Figura 11: Intensidade média de fluorescência dos parasitos das cepas de *L. (V.) braziliensis* incubados com Bodipy® 493/503 em diferentes fases do crescimento *in vitro*. Observar que parasitos da cepa LMC da fase EST-T apresentou maior média de intensidade de fluorescência quando comparado com a fase EST-I e com parasitos da cepa LCL. A cepa LCL não obteve diferença significativa entre as fases de crescimento estudadas. Teste utilizado: Teste t de Student. (*) $p < 0,05$ significativo; (**) $p < 0,01$ nível de significância alto; (***) $p < 0,001$ bastante significativo.

5.3. ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO DOS PARASITOS

A análise da composição de lipídios totais de *L. (V.) braziliensis* mostrou que os parasitos estudados apresentam além de fosfolipídios, uma variedade de lipídios neutros associados, como esterois, esterois esterificados, triglicerídeos e ácidos graxos. Parasitos responsáveis pela LCL na fase EST-T aumentam significativamente a quantidade de lipídios totais quando comparados com a fase EST-I, como mostrado na figura 12A. Parasitos da cepa LMC na fase EST-T aumentam apenas a quantidade de esteróis e esterois esterificados, enquanto que a quantidade de triglicerídeos, ácidos graxos e fosfolipídios é reduzida quando comparados com a fase EST-I (figura 12B).

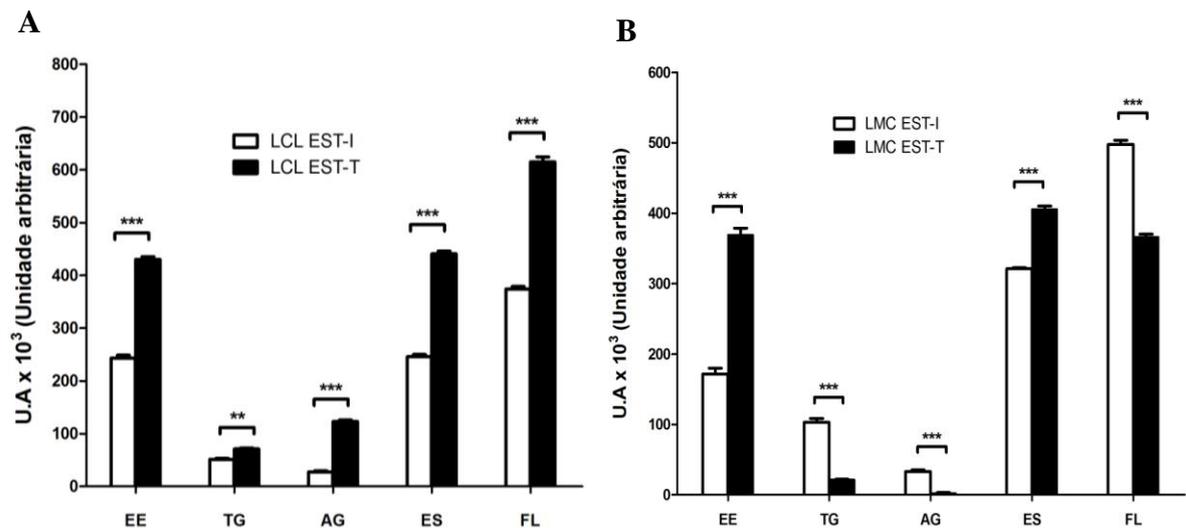


Figura 12: Gráfico demonstrando a distribuição de lipídios totais em promastigotas de *L. (V.) braziliensis* responsáveis pela LCL e LMC nas fases EST-I e EST-T. (A) Nos parasitos da cepa LCL, observar o aumento significativo dos lipídios identificados na fase EST-T. (B) Nos parasitos da cepa LMC, notar aumento significativo de esterois esterificados e esteróis, e redução significativa de TG, AG e FL na fase EST-T. Teste utilizado: teste t de Student. (*) $p < 0,05$ significativo; (**) $p < 0,01$ nível de significância alto; (***) $p < 0,001$ bastante significativo. EE: esterois esterificados; TG: triglicerídeos; AG: ácidos graxos; ES: esterois; FL: fosfolipídios.

Comparando os dados da composição de lipídios totais entre as cepas, na fase EST-I, a cepa LCL apresenta significativamente maior quantidade de EE e menor quantidade de TG, esterol e FL, quando comparado com a cepa LMC. Não houve diferença significativa de AG entre as cepas na fase estudada (figura 13A). Contudo, na fase EST-T, a cepa LCL apresenta significativamente maior quantidade de todos os lipídios identificados na análise, quando comparado com a cepa LMC (figura 13B).

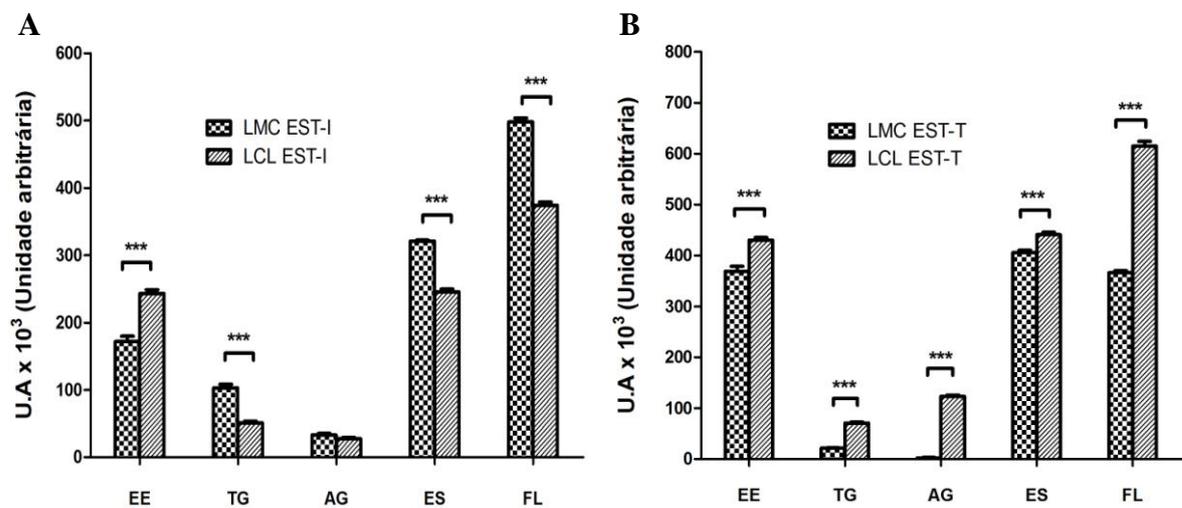


Figura 13: Gráfico demonstrando a distribuição de lipídios totais em promastigotas de *L. (V) braziliensis* responsáveis pela LCL e LMC nas fases EST-I e EST-T. (A) Na fase EST-I, notar que não há diferença significativa de AG entre as cepas. A cepa LCL apresenta significativamente maior quantidade de EE nessa fase. A cepa LMC apresenta maior quantidade de TG, EST e FL. (B) Na fase EST-T, observar que a cepa LCL apresenta significativamente maior quantidade de todos os lipídios identificados na análise. Teste utilizado: teste t de Student. (*) $p < 0,05$ significativo; (**) $p < 0,01$ nível de significância alto; (***) $p < 0,001$ bastante significativo. EE: esterol esterificado; TG: triglicerídeos; AG: ácidos graxos; ES: esterol; FL: fosfolipídios.

6. DISCUSSÃO

Nos últimos dez anos o número de casos relatados de pacientes com LTA no Brasil, principalmente na região amazônica, aumentou consideravelmente. Essa antroponose possui uma diversidade de agentes, reservatórios e vetores que apresentam diferentes padrões de transmissão. Além disso, o conhecimento a cerca do processo de interação do parasito com a célula hospedeira que ocorre nessa patologia ainda é limitado (BRASIL, 2007; REITHINGER et al., 2007).

Com o avanço no campo da biologia celular, diferentes ferramentas foram desenvolvidas e utilizadas para a análise de diferentes aspectos relacionados aos vetores, hospedeiros e aos parasitos. Métodos citoquímicos e imunocitoquímicos associados à microscopia eletrônica de transmissão são utilizados para localização de proteínas básicas, DNA, ribonucleotídeos, carboidratos, lipídios e outras moléculas nos vários tipos celulares, inclusive em protozoários (CAVALCANTI et al., 2008).

Diversos estudos já foram realizados para determinar processos bioquímicos e moleculares da leishmania e várias moléculas associadas aos processos patogênicos já foram caracterizadas, como o LPG, glicoconjugados como o glicofosfatidilinositol (GPI) e proteínas ancoradas via GPI, como a gp63, que possuem papel importante durante o processo de interação (BRITTINGHAM et al., 1995; DESCOTEAUX & TURCO, 1999; YONEYAMA et al., 2006). Estes estudos podem fornecer novos alvos quimioterápicos a partir do bloqueio seletivo de suas funções no ciclo de vida e na interação parasito-hospedeiro (REBELLO et al., 2009). Porém, com a espécie *L. (V.) braziliensis* poucos estudos experimentais foram desenvolvidos devido à dificuldade de obtenção de formas promastigotas metacíclicas, a necessidade de condições especiais para manutenção deste parasito em cultivo e, além disso, a maioria das linhagens de camundongos utilizados como modelos experimentais mostra-se resistente à infecção por essa espécie de leishmania, mesmo quando há a inoculação de um grande número de parasitos (PASSERO et al., 2011).

Lipídios são moléculas importantes, pois estão envolvidos na formação das membranas celulares, reserva de energia e desempenham importante papel na modificação pós-transducional que regula a localização e função de várias proteínas (MAZUMDAR & STRIEPEN, 2007). Essas moléculas têm sido objeto de estudos em protozoários do gênero *Leishmania*, por conferir resistência às drogas utilizadas para tratamento. A via biossintética dos esteróis está dentre os alvos terapêuticos da leishmania, pois o ergosterol, produto final

sintetizado nessa via, pode ser inibido por enzimas próprias do parasito que não existem nas células de mamíferos (CHAWLA & MADHUBALA, 2010).

O presente trabalho permitiu caracterizar e avaliar a distribuição de lipídios em cepas de *L. (V.) braziliensis* que causam diferentes manifestações clínicas da LTA e ainda quantificar a distribuição de CLs entre os parasitos durante a fase estacionária do crescimento *in vitro* que é o período de maior infectividade do parasito.

Os dados mostraram que a cepa LCL aumentou significativamente a quantidade de lipídios totais ao passar para a fase estacionária tardia de crescimento. Isso indica que esta cepa parece necessitar de grande quantidade de lipídios para seu metabolismo durante a fase infectiva. O metabolismo lipídico é importante para virulência, crescimento, replicação e diferenciação de espécies de leishmania no hospedeiro (ZUFFEREY & MAMOUN, 2005). Lipídios neutros como esterol esterificado, esteróis e triglicerídeos são fontes de ácidos graxos em tripanossomatídeos (DIXON & WILLIAMSON, 1970; FLORIN-CHRISTENSEN et al., 1997). RAMOS et al. (2009) observaram durante a fase estacionária de crescimento que promastigotas de *L. (V.) shawi* acumulam triglicerídeos, ácidos graxos, esterol esterificado, esteróis e fosfolipídios, e sugerem que esses lipídios podem ser necessários para multiplicação e interação do parasito com a célula do hospedeiro, além de manter as promastigotas infectantes e metabolicamente ativas até sua penetração no macrófago.

Segundo FARIAS et al. (2013), na fase estacionária tardia a cepa LCL é mais infectiva que a cepa LMC. Este dado justifica a presença de grande quantidade de lipídios totais identificado na cepa LCL durante essa fase, quando comparado com a cepa LMC. Para a cepa LCL, esses lipídios devem ser fundamentais para sua infectividade, podendo ser importantes na constituição de blocos de membrana, como glicoconjugados associados a subdomínios de membrana, que favorecem o rápido reconhecimento e fagocitose pela célula hospedeira. A cepa LMC, menos infectiva, aparenta ter um metabolismo lipídico diferenciado. Durante a fase estacionária tardia parecem consumir triglicerídeos e ácidos graxos, e aumentam a quantidade de esterol esterificado e esteróis no parasito. Além disso, a quantidade de fosfolipídios também é reduzida.

Estudos com *L. (V.) braziliensis* mostraram que glicoconjugados, âncoras de GPI associados com subdomínios lipídicos presentes na membrana celular, são ricos em colesterol e esfingolipídios (*lipid rafts*) e essenciais para a infectividade do parasito, sendo capazes de modular a resposta celular do hospedeiro (YONEYAMA et al., 2006; ASSIS et al., 2012). Porém é importante ressaltar que a maior infectividade da cepa LCL quando comparada à cepa LMC, resulta em um menor processo inflamatório.

Como descrito anteriormente, tripanossomatídeos armazenam ésteres de esterol, esteróis e triglicerídeos, como fonte de reserva endógena de energia, que se acumulam no citoplasma na forma de CLs. Estudos recentes mostraram que os CLs são organelas que podem contribuir para a infectividade dos parasitos. A distribuição e a importância de CLs em parasitos da espécie *L. (V.) braziliensis* ainda não está totalmente esclarecida.

No presente estudo foi possível observar pela análise ultraestrutural dos protozoários nas diferentes fases de crescimento, a presença de CLs no citoplasma das promastigotas nas duas cepas de *L. (V.) braziliensis*. Estes resultados foram confirmados pela análise citoquímica pelo método ósmio-imidazol e sugere que este protozoário acumula no seu citoplasma lipídios que podem ser utilizados como fonte energética endógena ou como precursores de lipídios mais complexos.

Os dados obtidos por citometria de fluxo permitiram analisar comparativamente a distribuição de CLs presentes no citoplasma das diferentes cepas. Nas promastigotas da cepa LCL não houve diferença significativa na presença de CLs no citoplasma entre as fases estudadas. Porém, nas promastigotas da cepa LMC foi observado grande acúmulo de CLs durante a fase estacionária tardia. RAMOS et al. (2009) mostraram que as promastigotas de *L. (V.) shawi* apresentaram grande número de CLs na fase estacionária quando comparado com a fase logarítmica, que podem ser importantes para interação do parasito com a célula do hospedeiro.

Pacientes infectados pela cepa LMC apresentam uma exacerbada resposta inflamatória quando comparado com a cepa LCL. De acordo com ARAÚJO et al. (2011) o aumento de CLs em protozoários da espécie *L. (L.) chagasi* durante seu crescimento *in vitro* está relacionado com síntese e liberação de prostaglandinas, moléculas relacionadas com o processo inflamatório. Os autores sugerem novas funções para esta organela no metabolismo celular da leishmania, com possíveis implicações na interação com o hospedeiro. Desta forma, o aumento de CLs nas promastigotas da cepa LMC pode estar associado à severa forma clínica, caracterizada pela exacerbada resposta imune celular.

Infecção pelo protozoário *L. (L.) amazonensis* induzem aumento da produção de CLs e PGE₂ em macrófagos de camundongos (PINHEIRO et al. 2009). Parasitos da cepa LMC também podem apresentar maior resposta inflamatória porque além de apresentar maior quantidade de CLs, e teoricamente maior quantidade de PGE₂, podem ser capazes de induzir aumento dessas estruturas e moléculas em macrófagos do hospedeiro. CLs e PGE₂ presentes no parasito e no fagócito do hospedeiro podem atuar em sinergia resultando em uma manifestação clínica mais severa.

Outra hipótese sugerida que pode explicar a grande presença de CLs na cepa LMC esta relacionada com a exposição de fosfatidilserina (FS). A translocação da FS para a superfície externa da membrana plasmática é considerada o principal marcador bioquímico durante o processo de apoptose inicial em células eucarióticas. Esse fosfolípido estimula a atividade fagocítica de macrófagos, inibindo sua reação inflamatória. Em células fisiologicamente normais, a exposição da FS na superfície externa da membrana plasmática é regulada por sistemas enzimáticos dependentes de energia, na qual a translocação *out-to-in* é realizada pela atividade de uma transferase dependente de ATP que impede a exposição do fosfolípido (SCHUFFER et al., 2009). Durante a fase estacionária, a espécie *L. tropica* é capaz de aumentar a exposição de FS na superfície externa, devido à redução da atividade da transferase responsável pela translocação *out-to-in*, regulando sua infectividade (TRIPATHI & GUPTA, 2003).

A maior infectividade da cepa LCL durante a fase estacionária tardia foi verificada pela maior exposição de FS (FARIAS et al., 2013). Conseqüentemente, na cepa LCL, a atividade da transferase dependente de ATP é reduzida, enquanto na cepa LMC essa atividade é elevada, necessitando de grande quantidade de energia, que pode ser proveniente dos CLs, que podem constituir uma fonte de energia endógena. Nesse estudo o conteúdo lipídico presente nos CLs não pode ser caracterizado, porém a partir da análise de composição de lipídios totais do parasito, pode-se supor que houve consumo de triglicerídeos e ácidos graxos por parasitos da cepa LMC quando analisado o perfil lipídico total da fase EST-I para a fase EST-T, o que pode caracterizar gasto energético.

Contudo, mais estudos são necessários para confirmar a importância dos CLs para protozoários do gênero *Leishmania*, bem como sua importância para a infectividade ou seu envolvimento na resposta imunológica pelo hospedeiro, e conseqüentemente, manifestação clínica.

Este estudo, portanto, permitiu observar características importantes que ajudam diferenciar formas promastigotas de cepas de *L. (V.) braziliensis* isoladas de diferentes manifestações clínicas e obtidas em diferentes dias de cultivo *in vitro*. Estudos acerca da estrutura e função de CLs, além de outras estruturas citoplasmáticas em protozoários parasitos da espécie, são importantes para obtenção de conhecimento sobre a fisiologia do parasito, no intuito de identificar possíveis alvos terapêuticos, além de fornecer uma possível correlação da distribuição destas estruturas com os diferentes comportamentos clínicos da doença.

7. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados e discutidos permitem concluir que:

- Parasitos da espécie *L. (V.) braziliensis* que causam LCL apresentam grande quantidade de lipídios totais durante a fase estacionária tardia;
- Não houve diferença na distribuição de corpos lipídicos na cepa LCL entre a fase estacionária inicial e tardia do crescimento;
- Parasitos da espécie *L. (V.) braziliensis* que causam LMC parecem consumir triglicerídeos e ácidos graxos e acumular ésteres de esterol e esteróis, mostrando um metabolismo lipídico diferenciado que pode estar relacionado com a sua forma clínica;
- Durante a fase estacionária tardia, parasitos da cepa LMC tiveram significativamente aumento da produção de corpos lipídicos, estruturas conhecidas como sítios de produção de eicosanoides, o que também pode ser correlacionado com a forma clínica apresentado por essa cepa.

8. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

- **Setembro 2011:** Participação no XXVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology - XXXVIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease, realizado pela Sociedade Brasileira de Protozoologia, em Foz do Iguaçu/PR.
Trabalho apresentado: Lipid droplets identification in *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes caused of mucosal leishmaniasis (ANEXO I).

- **Novembro 2011:** Participação no III Encontro Anual do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagens (INBEB), em Rio de Janeiro/RJ.
Trabalho apresentado: Lipid droplets identification in *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes caused of mucosal leishmaniasis (ANEXO II).

- **Dezembro 2011:** Participação no Simpósio de Biologia Celular de Patógenos, oferecido pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular na UFPA, em Belém/PA.
Apresentação oral: Análise de corpos lipídicos em duas cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em diferentes dias de cultivo *in vitro* (ANEXO III).

- **Julho 2012:** Participação no 10th International Congress on Cell Biology and XVI Meeting of the Brazilian Society for the Cell Biology.
Trabalho apresentado: Analysis of lipid droplets in *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes in the early stationary phase of the growth (Anexo IV).

9. MESTRADO SANDUÍCHE

Mestrado sanduíche realizado no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no período de 17 de outubro a 17 de novembro de 2011, através do PROCAD NF21/2009.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGERMÜLLER, S. & FAHIMI, H. D. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. **Histochem J** **14**: 823-835, 1982.
- ARAÚJO, T.; PONTES, S. M.; RODRIGUEZ, N. E.; ABANÁDEZ, D. R.; BOZZA, P. T. WILSON, M. E. & BORGES, V. M. Role of lipid bodies from *Leishmania chagasi* in the prostaglandin production. In: XXVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology - XXXVIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease, 2011, Hotel Rafain Palace (Foz do Iguaçu). **Anais de resumo da Sociedade Brasileira de Protozoologia (SBPz)**. Foz do Iguaçu/PR: 2011. Pág. 29.
- ASSIS, R. R.; IBRAIM, I. C.; NORONHA, F. S.; TURCO, S. J. & SOARES, R. P. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: Modulation of Innate Immune System and Variations in Carbohydrate Structure. **PLoS Negl Trop Dis** **6** (2): e1543. 2012.
- BAILEY, M. S. & LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous leishmaniasis. **Clin Dermatol** **25**: 203-211, 2007.
- BAÑULS, A. L.; HIDE, M. & PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances in parasitology** **64**: 1-109. 2007.
- BASANO, S. A. & CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev Bras Epidemiol** **7** (3): 328-337, 2004.
- BATES, P. A. The Developmental Biology of *Leishmania* Promastigotes. **Exp Parasitol** **79**: 215-218, 1994.
- BATES, P. A. Housekeeping by *Leishmania*. **Trends Parasitol** **22**: 447-448, 2006.
- BELLER, M.; THIEL, K.; THUL, P. J. & JÄCKLE, H. Review. Lipid droplets: A dynamic organelle moves into focus. **FEBS Letters** **584**: 2176-2182, 2010.
- BICKEL, P. E.; TANSEY, J. T. & WELTE, M. A. PAT proteins, an ancient family of

lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. **Biochim Biophys Acta** **1791**:419–440, 2009.

BLANER, W. S.; O'BYRNE, S. M.; WONGSIRIROJ, N.; KLUWE, J.; D'AMBROSIO, D.M.; JIANG, H.; SCHWABE, R. F.; HILLMAN, E. M.; PIANTEDOSI, R.; LIBIEN, J. Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. **Biochim Biophys Acta** **1791** (6): 467-473. 2009.

BLIGH, E.G. & DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology** **37**: 911–913, 1959.

BOZZA, P.T.; MELO, R.C.N. & BANDEIRA-MELO, C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. **Pharmac Ther** **113**: 30-49, 2007.

BOZZA, P.T.; NAGALHÃES, K.G. & WELLER, P.F. Leukocyte lipid bodies - biogenesis and functions in inflammation. **Biochim Biophys Acta** **1791**: 540-551, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Editora MS, 2006.** http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/atlas_lta.pdf. Último acesso em: 01/04/2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Editora MS, 2ª Ed., 2007.** Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf. Último acesso em: 01/04/2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Situação Epidemiológica: Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2010. Brasília/DF, 2011.** Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta_casos08_09_11.pdf. Último acesso em: 01/04/2012.

- BRITTINGHAM, A.; MORRISON, C. J.; MCMASTER, W. R.; MCGWIRE, B. S.; CHANG, K. P. & MOSSER, D. M. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **J Immunol** **155** (6): 3102-3111. 1995.
- CAMPOS, M. B.; GOMES, C. M. C.; SOUZA, A. A. A.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. & SILVEIRA, F. T. *In vitro* infectivity of species of *Leishmania* (*Viannia*) responsible for American cutaneous leishmaniasis. **Parasitol Res** **103**: 771-776, 2008.
- CAVALCANTI, D. P.; THIRY, M.; DE SOUZA, W. & MOTTA, M. C. M. The kinetoplast ultrastructural organization of endosymbiont-bearing trypanosomatids as revealed by deep-etching, cytochemical and immunocytochemical analysis. **Histochem Cell Biol**, **130**: 1177-1185, 2008.
- CHAGAS, A. C.; PESSOA, F. A. C.; DE MEDEIROS, J. F.; PY-DANIEL, V.; MESQUITA, E. C. & BALESTRASSI, D. A. Leishmaniose TegumentarAmericana (LTA) em uma vila de exploração de minérios - Pitinga, município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. **Rev Bras Epidemiol** **9**: 186-192, 2006.
- CHARRON, A.J. & SIBLEY, L.D. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **J Cell Sci** **115**: 3049–3059, 2002.
- CHAWLA, B. & MADHUBALA, R. Drug targets in Leishmania. **J Parasit Dis** **34** (1): 1-13. 2010.
- COCCHIARO, J. L.; KUMAR, Y.; FISCHER, E. R.; HACKSTADT, T. & VALDIVIA, R. H. Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the *Chlamydia trachomatis* parasitophorous vacuole. **PNAS** **105** (27): 9379-9384, 2008.
- DE ALMEIDA, D. C. G. & BOAVENTURA, M. F. C. Parte 2: Princípios básicos. Capítulo 8: Fases do crescimento celular – Curva de crescimento. PERES, C. M. & Curi, R. **Como cultivar células**. Editora Guanabara Koogan S. A. 2005. p 35-37.
- DE OLIVEIRA, C. I. & BRODSKYN, C. I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Front Immunol** **3** (145): 1-9, 2012.
- DESCOTEAUX, A. & TURCO, S. J. Glycoconjugates in Leishmania infectivity.

Biochim Biophys Acta 1455: 341–352. 1999.

DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitol Res 88:** 1013-1025, 2002.

DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C. & CUNHA-E-SILVA, N. L. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. **Prog Histochem Cytochem 44:** 67-124, 2009.

DVORAK, A.M.; DVORAK, H. F.; PETERS, S. P.; SHULMAN, E. S.; MACGLASHAN, D. W. JR.; PYNE, K.; HARVEY, V. S.; GALLI, S. J. & LICHTENSTEIN, L.M. Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. **J Immunol 131:** 2965-2976. 1983.

DIXON, H. & WILLIAMSON, J. The lipid composition of blood and culture forms of *T. lewisi* and *T. rhodesiense* compared with that of their environment. **Comp Biochem Physiol 33:**111–128. 1970.

DOCAMPO, R. & MORENO, S. N. J. The acidocalcisome. **Mol Biochem Parasitol, 33:** 151-159. 2001.

ESTERRE, P.; DEDET, J. P.; FRENAY, C.; CHEVALLIER, M. & GRIMAUD, J. A. Cell populations in the lesion of human cutaneous leishmaniasis: a light microscopical, immunocytochemical and ultrastructural study. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 421:** 239-247, 1994.

FARESE, R. V., JR. & WALTHER, T. C. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. **Cell 139 (5):** 855-60, 2009.

FARIAS, L. H. S.; RODRIGUES, A. P. D.; SILVEIRA, F. T.; SEABRA, S. H.; DAMATTA, R. A.; SARAIVA, E. M. & SILVA, E. O. Phosphatidylserine exposure and surface sugars in two *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains involved in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **J Infect Dis 207 (3):** 537-543, 2013.

FLORIN-CHRISTENSEN, M.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; DE ISOLA, E. D.; LAMMEL, E.; MEINARDI, E.; BRENNER, R. R.; RASMUSSEN, L. Temperature acclimation of *Trypanosoma cruzi* epimastigote and metacyclic trypomastigote lipids. **Mol Biochem Parasitol 88:** 25–33.1997.

- GARTON, N.J.; CHRISTENSEN, H.; MINNIKIN, D. E.; ADEGBOLA, R. A. & BARER, M. R. Intracellular lipophilic inclusions of mycobacteria *in vitro* and in sputum. **Microbiology** **148**: 2951-2958, 2002.
- GOMES-SILVA, A.; BITTAR R. C.; NOGUEIRA, R. S.; AMATO, V. S. ; MATTOS, M. S.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; COUTINHO, S. G. & CRUZ, A. M. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? **Clin Exp Immunol**, **149**: 440-444, 2007.
- GREENBERG, A. S.; EGAN, J. J.; WEK, S. A.; GARTY, N. B.; BLANCHETTE-MACKIE, E. J. & LONDOS, C. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. **J Biol Chem** **266**: 11341–11346, 1991.
- GRIMALDI JR., G. & TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin Microbiol Rev** **6**: 230-250, 1993.
- GUEIRARD, P.; LAPLANTE, A.; RONDEAU, C.; MILON, G. & DESJARDINS, M. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. **Cell Microbiol** **10**: 100-111, 2008.
- HERKER, E. & OTT, M. Emerging role of lipid droplets in host/pathogen interactions. **J Biol Chem** **287** (4): 2280–2287, 2012.
- JACKSON, K. E.; KLONIS, N.; FERGUSON, D. J.; ADISA, A.; DOGOVSKI, C. & TILLEY, L. Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. **Mol Microbiol** **54**: 109–122, 2004.
- JÄGERSTRÖM, S., POLESIE, S., WICKSTRÖM, Y., JOHANSSON, B.R., SCHRÖDER, H.D., HOJLUND, K. AND BOSTRÖM, P. Lipid droplets interact with mitochondria using SNAP23. **Cell Biol Int** **33**: 934–940, 2009.
- JU, O.; GROVE, D. I.; JAKSIC, W. J. & DART, G. W. Visceral leishmaniasis: a trip to the Greek Islands is not always idyllic. **Med J Aust** **181**: 446-447, 2004.
- KAYE, P. & SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol** **9** (8): 604-615. 2011.

- LAINSON, R. & SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniases in Biology and Medicine, Biology and Epidemiology*. W. Peters & R. Killick-Kendrick (eds.). London, **Academic Press 1**: 1-120, 1987.
- LEHNER, R.; CUI, Z.; VANCE, D.E. Subcellular localization, developmental expression and characterization of a liver triacylglycerol hydrolase. **Biochem J 338**: 761-768. 1999.
- LIU, P.; YING, Y.; ZHAO, Y.; MUNDY, D.I.; ZHU, M. & ANDERSON, R.G.W. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. **J Biol Chem 279**: 3787-3792, 2004.
- LONDOS, C.; SZTALRYD, C.; TANSEY, J.T. & KIMMEL, A.R. Role of PAT proteins in lipid metabolism. **Biochimie 87**: 45-49, 2005.
- MARTIN, S. & PARTON, R.G. Caveolin, cholesterol, and lipid bodies. **Semin Cell Dev Biol 16**: 163-174, 2005.
- MARTIN, S., PARTON, R.G. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. **Nat Rev Moll Cell Biol 7**: 373-378, 2006.
- MAZUMDAR, J. & STRIEPEN, B. Make it or take it: fatty acid metabolism of apicomplexan parasites. **Eukaryot Cell 6** (10):1727-1735. 2007.
- MCCONVILLE, M. J.; DE SOUZA, D.; SAUNDERS, E.; LIKIC, V. A. & NADERER, T. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. **Trends in Parasitol 23**: 368-375, 2007.
- MELO, R. C.; D'AVILA, H.; WAN, H. C.; BOZZA, P. T.; DVORAK, A. M. & WELLER, P. F. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function and current imaging techniques. **J Histochem Cytochem 59** (5): 540-56, 2011.
- MELO, R. C. N.; D'ÁVILA, H.; FABRINO, D. L.; ALMEIDA, P. E. & BOZZA, P. T. Macrophage lipid body induction by Chagas disease *in vivo*: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. **Tissue & Cell 35**: 59-67, 2003.
- MICHALICK, M. S. M. & RIBEIRO, R. R. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D. P.

Parasitologia Humana. 12^a Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2011. Cap. 7, p. 41-44.

MIRANDA, K.; DE SOUZA, W.; PLATTNER, H.; HENTSCHEL, J.; KAWAZOE, U.; FANG, J. & MORENO, S. N. J. Acidocalcisomes in Apicomplexan parasites. **Exp Parasitol** **118**: 2–9, 2008.

MORGADO, F. N.; SCHUBACH, A.; ROSALINO, C. M. V.; QUINTELLA, L. P.; SANTOS, G.; SALGUEIRO, M. & CONCEIÇÃO, S. Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? **Br J Dermatol** **158**: 50–58, 2008.

MOTTRAM, J. C. & COOMBS, G. H. *Leishmania mexicana*: Enzyme Activities of Amastigotes and Promastigotes and their Inhibition by Antimonials and Arsenicals. **Exp Parasitol** **59**: 151-160, 1985.

MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. Review. **Progress in Lipid Research** **40**: 325–438, 2001.

MURPHY, S., MARTIN, S. AND PARTON, R.G. Lipid droplet–organelle interactions; sharing the fats. **Biochim Biophys Acta** **1791**: 441–447, 2009.

NADERER, T. & MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cell Microbiol** **10**: 301-308, 2008.

NEUBER, H. Leishmaniasis. **J Dtsch Dermatol Ges** **6**: 754-65, 2008.

NOGUEIRA, M.F.; SOTTO, M.N. & CUCÉ, L.C. American tegumentary leishmaniasis: Langerhans cells in Montenegro skin test. **Rev Inst Med Trop São Paulo** **50**: 283-286, 2008.

PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D. & SANTOS-GOMES, G. Modelos Roedores utilizados no Estudo da Leishmaniose Tegumentar Americana. In: BARRAL, A. & COSTA, J. M. L. (Ed.). **Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas**. 1^a Ed. Salvador, 2011. Cap. 8, p. 75-87.

PINHEIRO, R. O.; NUNES, M. P.; PINHEIRO, C. S.; D'AVILA, H.; BOZZA, P. T.; TAKIYA, C. M.; CÔRTE-REAL, S.; FREIRE-DE-LIMA, C. G. & DOS REIS, G. A. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. **Microbes Infect** **11**(2):

181-190, 2009.

- RAMOS, P. K.; DINIZ, J. A.; SILVA, E. O.; QUARESMA, J. A.; SARAIVA, E. M.; SEABRA, S. H.; ATELLA, G. C. & DE SOUZA, W. Characterization *in vivo* and *in vitro* of a strain of *Leishmania (Viannia) shawi* from the Amazon Region. **Parasitol Int**, **58**:154-160, 2009.
- RASMUSSEN, B. & DESCOTEAUX, A. Contribution of Electron and confocal microscopy in the study of *Leishmania*-macrophage interactions. **Microsc Microanal** **10**: 656-661, 2004.
- REBELLO, K. M.; CÔRTEZ, L. M. C.; PEREIRA, B. A. S.; PASCARELLI, B. M. O.; CÔRTE-REAL, S.; FINKELSTEIN, L. C.; PINHO, R. T.; D'AVILA-LEVY, C. M. & ALVES, C. R.. Cysteine proteinases from promastigotes of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Parasitol Res** **106**: 95-104, 2009.
- REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B. & BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis** **7**: 581–596, 2007.
- ROSS R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **Br. Med. J. II**: 1261-1262, 1903.
- SACKS, D. L. & PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science** **223**: 1417-1419, 1984.
- SAKA, H. A. & VALDIVIA, R. Emerging Roles for Lipid Droplets in Immunity and Host-Pathogen Interactions. **Annu Rev Cell Dev Biol** **28**:4.1–4.27, 2012.
- SAKTHIANANDESWAREN, A.; FOOTE, S. T. & HANDMAN, E. The role of host genetics in Leishmaniasis. **Trends in Parasitol** **25**: 383–391, 2009.
- SCHUFFNER, A.; URBANETZ, A. A.; CARVALHO, N.S.; OLIVEIRA, M. T. C. R.; DRECHMER, M.; PLACIDO, T. Morte celular programada e peroxidação lipídica no espermatozoide humano. **FEMINA** **37 (6)**: 313-318. 2009.
- SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R. & CORBETT, C. E. P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **99**: 239-51, 2004.

- SILVEIRA, F. T.; MÜLLER, S. R.; DE SOUZA, A. A. A.; LAINSON, R.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI & M. D.; CORBETT, C. E. P.; Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina** 22 (1): 9-20, 2008.
- SOARES, M. J. Detecção de Lipídios. Cap. 10, p. 110-116. In: DE SOUZA, W (Ed.). **Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007. 357 p.
- SOUZA, C. S. F.; MAIA, H.; CALABRESE, K. S.; ROSA, M. S. S.; CUPOLILO, S. M. N.; DA COSTA, S. C. G. & DO VALLE, T. Z.. As Leishmanioses. Departamento de protozoologia. **Fundação Oswaldo Cruz**, 1997.
- TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; CREPALDI, P. H.; PIMENTA, P. F. P & DE SOUZA, W. **Atlas didático: Ciclo de vida da Leishmania**. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2013.
- TRIPATHI, A. & GUPTA C.M. Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania* promastigotas. **Mol Biochem Parasitol** 128: 1–9, 2003.
- VALE, E. C. S. & FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **An Bras Dermatol** 80: 421-428, 2005.
- VANNIER – SANTOS, M. A.; MARTINY, A. & DE SOUZA, W. Cell Biology of *Leishmania* spp.: Invading and Evading. **Curr Pharmac Design** 8: 297–318, 2002.
- WALTHER, T. C. & FARESE JR, R. V. Lipid Droplets and cellular Lipid Metabolism. **Annu Rev Biochem** 81:28.1–28.28, 2012.
- WALTHER, T. C. & FARESE JR, R. V. The life of lipid droplets. **Biochimica et Biophysica Acta** 1791: 459–466, 2009.
- WENK, M. R. Lipidomics of host-pathogen interactions. **FEBS Lett** 580 (23): 5541-5551, 2006.
- WHO. World Health Organization (2012). Programmes and projects. Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Último acesso em: 08/11/2012.

YONEYAMA, K. A.; TANAKA, A. K.; SILVEIRA, T. G.; TAKAHASHI, H. K. & STRAUS, A. H. Characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* membrane microdomains, and their role in macrophage infectivity. **J Lipid Res** **47** (10): 2171-2178. 2006.

ZUFFEREY, R. & MAMOUN, C. B. The initial step of glycerolipid metabolism in *Leishmania major* promastigotes involves a single glycerol-3-phosphate acyltransferase enzyme important for the synthesis of triacylglycerol but not essential for virulence. **Mol Microbiol** **56**: 800–810. 2005.

ANEXOS

ANEXO I

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS



CERTIFICATE

We hereby certify that the abstract entitled Identification of lipid droplets in Leishmania (Viannia) braziliensis promastigotes cause mucosal leishmaniasis by authors Hage, A.A.P.; Rodrigues, A.P.D.; Farias, L.H.S.; Silva, E.O.

was presented during the XXVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology / XXXVIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease in Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, from September 19th to 21st, 2011.

Angela Kaysel Cruz
President

M Carolina Elias
Secretary



CERTIFICATE

AMANDA ANASTACIA PINTO HAGE

Registration - **21** participated in the XXVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology / XXXVIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease in Foz do Iguaçu – Paraná - Brasil, from September 19th to 21st, 2011.

Angela Kaysel Cruz
President

M Carolina Elias
Secretary

III Encontro Anual do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB)

Certificado

Certifico que Amanda Anastácia Pinto Hage apresentou o trabalho "LIPIDS DROPLETS IDENTIFICATION IN Leishmania (Viannia) braziliensis PROMASTIGOTES CAUSED OF MUCOSAL LEISHMANIASIS" no III Encontro Anual do INBEB, realizado nos dias 28, 29 e 30 de novembro de 2011, na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).



Coordenador do INBEB
Professor Jerson Lima da Silva

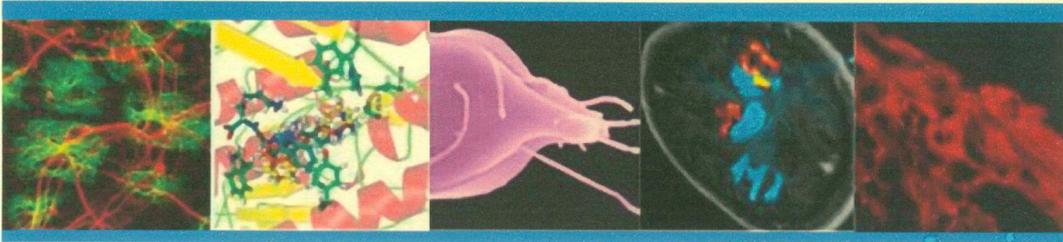
INBEB
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
de Biologia Estrutural e Bioimagem

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico

FAPERJ
Fundação de Amparo
à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

DECIT
Departamento de
Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CAPE S





UFPA

Simpósio de Biologia Celular de Patógenos

Certificado

Certificamos que *Amanda Anastácia Pinto Hage* participou, na
 qualidade de *Palestrante* do **Simpósio de Biologia Celular de
 Patógenos**, promovido pelo Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade
 Federal do Pará no período de 01 a 02 de Dezembro de 2011 em Belém-PA.

Belém, 02 de Dezembro de 2011

Wanderley de Souza
 Dr. Wanderley de Souza
 Coordenador do Projeto
 Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Dr. José Luiz Martins do Nascimento
 Dr. José Luiz Martins do Nascimento
 Coordenador do Projeto
 Instituto de Ciências Biológicas
 CNPq / Casadinho

Dra. Edilene Oliveira da Silva
 Dra. Edilene Oliveira da Silva
 Coordenadora do Projeto PROCAD
 Instituto de Ciências Biológicas

Apoio:



ANEXO IV



We certify that

AMANDA ANASTÁCIA PINTO HAGE, NUCCIA N. T. DE CICCO, GEORGIA C. ATELLA, RAQUEL RAICK PEREIRA DA SILVA, BRUNO JOSÉ MARTINS SILVA, PAULA CRISTINA R. FRADE, ANA PAULA DRUMMOND RODRIGUES, EDILENE OLIVEIRA DA SILVA

presented the poster entitled

ANALYSIS OF LIPID DROPLETS IN LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS PROMASTIGOTES IN THE EARLY STATIONARY PHASE OF THE GROWTH

during the 10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology held at Riocentro Exhibition and Convention Center, Rio de Janeiro, Brazil, July 25th to 28th, 2012.



Hernandes F Carvalho
International Federation for Cell Biology IFCB



Patricia Gama
Brazilian Society for Cell Biology

Organizing Committee

Anne Eichmann | Bechara Kachar | Estela Bevilacqua | Flávia Gomes | Irene Yan
James Armitage | Marimélia Porcionatto | Marilice F Santos | Milton Moraes | Thereza Christina Barja -Fidalgo