

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DO LITORAL PAULISTA
UNIDADE DE SÃO VICENTE**

**ATIVIDADE DA FOSFOLIPASE A2 NA INFECÇÃO CAUSADA POR *LEISHMANIA*
(*LEISHMANIA*) *AMAZONENSIS***

CONTRIBUIÇÃO AO ENTENDIMENTO DA LEISHMANIOSE

Luiz Felipe Domingues Passero

**São Vicente -SP
2006**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS EXPERIMENTAL DO LITORAL PAULISTA
UNIDADE DE SÃO VICENTE**

**ATIVIDADE DA FOSFOLIPASE A2 NA INFECÇÃO CAUSADA POR *LEISHMANIA*
(*LEISHMANIA*) *AMAZONENSIS***

CONTRIBUIÇÃO AO ENTENDIMENTO DA LEISHMANIOSE

Luiz Felipe Domingues Passero

Orientador: Marcos Hikari Toyama

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Campus Experimental do Litoral Paulista - UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, modalidade Gerenciamento Costeiro.

São Vicente –SP

2006

Passero, Luiz Felipe Domingues

Atividade da fosfolipase A2 na infecção causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* – contribuição ao entendimento da leishmaniose / Luiz Felipe Domingues Passero. - São Vicente, 2006.

? p.

Trabalho de conclusão (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental do Litoral Paulista -Unidade São Vicente.

Orientador: Marcos H. Toyama; Márcia Dalastra Laurenti

1. Venenos - Toxinologia 2. *Leishmania*

CDD 574.92

Palavras-chaves: Venenos de serpentes, proteínas, parasitologia, fosfolipase A2, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Dedico esse trabalho ao tempo, mestre de
minha vida.

Oração ao tempo

És um senhor tão bonito quanto a cara do meu filho
Tempo tempo tempo tempo, vou lhe fazer um pedido
Tempo tempo tempo tempo

Compositor de destinos, tambor de todos os ritmos
Tempo tempo tempo tempo, entro num acordo contigo
Tempo tempo tempo tempo

Por seres tão inventivo e pareceres contínuo,
Tempo tempo tempo tempo, és um dos deuses mais lindos
Tempo tempo tempo tempo

Peço-te o prazer legítimo e o movimento preciso,
Tempo tempo tempo tempo, quando o tempo for propício
Tempo tempo tempo tempo

De modo que o meu espírito ganhe um brilho definido,
Tempo tempo tempo tempo, e eu espalhe benefícios
Tempo tempo tempo tempo

O que usaremos pra isso fica guardado em sigilo,
Tempo tempo tempo tempo, apenas conte comigo
Tempo tempo tempo tempo

E quando eu tiver saído para fora do teu círculo,
Tempo tempo tempo tempo, não serei nem terás sido
Tempo tempo tempo tempo

Ainda assim acredito ser possível reunirmo-nos,
Tempo tempo tempo tempo, num outro nível de vínculo
Tempo tempo tempo tempo...

Caetano Veloso

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeira instância aos meus amados pais, Cláudio e Aparecida, sem os quais jamais conseguiria algum direcionamento, em especial a minha mãe, com a qual compartilhei momentos belos e únicos.

Agradeço às minhas avós amadas “Vina e Cancan”.

Agradeço aos meus orientadores, Dr. Marcos Hikari Toyama e a Dra. Márcia Dalastra Laurenti (que por motivos burocráticos não pode ser incluída como minha co-orientadora neste trabalho), pela possibilidade de compartilhar momentos de aprendizagem e amizade.

Agradeço ao Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett pela compreensão, conselhos e sugestões que me foram essenciais no início da caminhada científica.

Agradeço a minha grande amiga e técnica do Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM 50), Thaíse Yumie Tomokane, por diversos momentos de discussão científica, apoio e irmandade, além é claro dos momentos de apreensão com os experimentos “inusitados” que foram realizados.

Agradeço aos amigos do LIM 50, Ana Carolina Stocco, Daniela Lorangeira, Dalila Certo, Edson Tadeu, Micheli Ibarra, Tadeu Perniccheli e Zenaide Forçan pela amizade e carinho constante.

Agradeço a Maria José e Roseli Silva do LIM 15 pela disposição e ajuda constante em todos os momentos.

Agradeço a Edite Hatsumi Yamashiro Kanashiro, do Instituto de Medicina Tropical, pela ajuda e carinho constantes.

Agradeço a Dra. Maria Júlia Alves Manso do Instituto de Química da Universidade de São Paulo pelas sugestões e amizade.

Agradeço aos meus amigos queridos da Unesp, Ana Carolina de A. Mazuco, Andréia Angeli, Bianca Regina da Hora, Carlos A. Tairum Jr, Carolina Almeida do Carmo, Elis Madeira Velho, Isabella Bordon, Juliana Maíra Watanabe, Karina Arackawa, Maisa Yto, Marília Bueno, Valéria Pereira de Siqueira e todos os outros que ficarão sempre em minha memória, especialmente ao grupo do Gerenciamento Costeiro, com o qual

compartilhei os melhores momentos da graduação.

Agradeço ao meu querido amigo e biólogo, Anselmo Augusto de Castro, por tantos momentos de discussão e aos momentos agradáveis que passamos nesse período.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo auxílio na Iniciação Científica, cujo aprendizado foi essencial para meu desenvolvimento, técnico, científico e pessoal.

RESUMO

O veneno de *Crotalus durissus collilineatus* (*C.d.co*) foi fracionado primeiramente por cromatografia em exclusão molecular, onde as principais frações foram purificadas pela massa molecular. Após esta primeira etapa, as frações provenientes da primeira cromatografia foram purificadas em HPLC de fase reversa, que permitiram a purificação das isoformas de fosfolipase A2 (PLA2) e crotapotinas (CRP) que foram confirmadas por eletroforese em PAGE-SDS. Após o isolamento foi verificada a atividade da PLA2 e CRP, em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Em tal modelo foi verificado que a PLA2 causou significativa proliferação dos parasitos, entretanto a CRP causou diminuição em 50% do número de promastigotas. Como tais proteínas não apresentaram citotoxicidade aos macrófagos, foi estudada a atividade dessas proteínas em modelos de infecção *in vitro*. Através da técnica ELISA *in situ* foi verificado que houve significativo aumento da infecção no modelo tratado com PLA2, entretanto a CRP não afetou a infecção. Para verificar se a PLA2 influiria na metaciclologênese foi estudada a morfometria dos grupos tratados e controles, resistência das formas promastigotas frente à lise por soro e quantificação de proteínas de lisado de promastigotas. Através desses procedimentos foi verificado que não houve diferenças significativas entre os grupos tratados e controle. Estudos *in vivo* mostraram perfil similar, pois nas biópsias de BALB/c foram encontradas maiores densidades de amastigotas que no grupo controle, o grupo tratado com CRP apresentou densidade de amastigotas similar ao do grupo controle. A análise histopatológica para o grupo da PLA2 mostra que há muitas regiões de necrose tecidual com grande influxo de células inflamatórias e uma elevada densidade de amastigotas, o grupo da CRP apresentou poucas regiões de necrose tecidual, com um elevado número de células inflamatórias no tecido, entretanto, foram encontradas baixas densidades de formas amastigotas, quando comparado ao grupo controle e ao grupo da PLA2. Com substrato específico, foi encontrada atividade fosfolipásica A2 em sobrenadante e lisado de *L.(L.)amazonensis*, e o uso de inibidores específicos de PLA2 como o pBPB diminuiu a atividade enzimática. Esses dados fortemente indicam que uma PLA2 está presente em parasitos *L. (L.) amazonensis* e que pode estar associada a virulência dos parasitos, possivelmente pela supressão de macrófagos através da geração de metabólitos do ácido araquidônico.

ABSTRACT

The PLA2 and crotapotin were purified from the *Crotalus durissus collilineatus* whole venom by combination of HPLC molecular exclusion and analytic reverse phase HPLC. The purity degree of the fraction phospholipase A2 (PLA2) or Crotapotin (CRP) were confirmed by SDS-PAGE and the enzymatic activity of PLA2 or CRP were confirmed using a synthetic chromogenic substrate specific for secretory PLA2. In promastigote forms the PLA2 increased the parasite growth rate in 50% (with 32µg/mL), however, the CRP decrease the parasite growth rate in 50% (with 32µg/mL). Both PLA2 and CRP did not show cytotoxic activity in macrophages that was estimated through of colorimetric reaction based in MTT formazan. Thus were evaluated the activities of PLA2 and CRP on infected macrophages with *L. (L.) amazonensis* in presence of PLA2 and CRP. After 24 hours was carried the ELISA *in situ* technique to evaluated the infection rate. Under this condition observed that PLA2 increased the infection rate, however the CRP did not show any effect on the infection. Studies about metacyclogenesis (morphometry, lyses mediated for human and protein quantification) made in presence of PLA2 or CRP did not induced significant differences between treated and control groups. To verify if the increase of parasite load was corroborated *in vivo*, BALB/c mice were infected with pre-treated promastigote forms with PLA2 and CRP. Through of measurement of footpad swelling was verify that treated promastigote forms with PLA2 were capable of induced a high footpad swelling if compared with control group, the CRP until 25th pos-infection day showed footpad swelling value lesser than the control group. The hystopatological analyses for PLA2 group showed that there were wildspraided necrosis regions with high inflammatory cells influx and a high amastigote forms density, the CRP group showed less regions of necrosis with a high inflammatory cells influx, however, were found few amastigota forms density, when compared with control and PLA2 groups. With specific substrate, was found phospholipasic A2 activity in *L. (L.) amazonensis* supernatant and lysate. The both phospholipase A2 activity was inhibited with pBPB inhibitor. This data strongly indicate that a PLA2 is present in *L. (L.) amazonensis* parasites and this enzyme should be a virulence factor, was most likely by macrophage suppression through of generation arachidonic acid metabolites.

Índice

Introdução	10
Material e Método	24
Fracionamento do veneno de <i>C. d. collilineatus</i>	24
Determinação da estrutura primária da PLA2	26
<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	26
Extração de macrófagos	26
Ensaio de citotoxicidade	27
Atividade da PLA2 e CRP em infecção experimental (<i>in vitro</i>) de <i>L.(L.) amazonensis</i>	26
Utilização de inibidores na infecção experimental (<i>in vitro</i>)	28
Testes para avaliação da metaciclo gênese	28
Atividade fosfolipásica A2 em promastigotas	30
Infecção <i>in vivo</i>	31
Análises histológicas	31
Outro modelo experimental	32
Análise estatística	33
Resultados	34
Fracionamento do veneno de <i>C. d. collilineatus</i> e atividade fosfolipásica A2	34
Determinação da estrutura primária da PLA2	36
Ensaio de citotoxicidade	39
Atividade da PLA2 e da CRP na infecção experimental (<i>in vitro</i>) de <i>L.(L.) amazonensis</i>	39
Atividade fosfolipásica A2 em promastigotas	40
Uso de Indometacina e Dexametasona na infecção experimental (<i>in vitro</i>)	41
Testes para avaliação da metaciclo gênese	42
Infecção <i>in vivo</i>	46
Análises histológicas	47
Outro modelo experimental	59
Discussão	60
Fracionamento do veneno total de <i>C. d. collilineatus</i> e atividade enzimática	60
Determinação da estrutura primária	60
Ensaio de Citotoxicidade	62
Tratamento de promastigotas com PLA2 e CRP	63
Testes de avaliação de metaciclo gênese	65
Atividade da PLA2 em macrófagos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> .	66
Infecção <i>in vivo</i>	69
Conclusão	72
Bibliografia	73

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Aspectos gerais das leishmanioses

A posição privilegiada que o homem confere à própria espécie fez com que vários séculos decorressem antes que aceitasse sua origem comum e reconhecesse suas relações de parentesco com os demais organismos da natureza, e ainda mais tempo até que fosse firmemente estabelecida a doença como uma das circunstâncias habituais e naturais da vida humana (Ávila-Pires, 2005).

Algumas doenças que têm re-emergido no território brasileiro não podem ser compreendidas simplesmente como uma circunstância natural da vida humana, pois os fatores relatados às doenças re-emergentes estão firmemente entrelaçados a alguns aspectos negativos da ação antrópica, como devastação florestal, ocupação desordenada do solo e deficiência no saneamento básico. Nessa esfera, encontram-se as doenças infecto-parasitárias, que comumente estão relacionadas à camada pauperizada da população.

As doenças tropicais que até décadas atrás haviam sido controladas pela devastação da cobertura vegetal primitiva dos grandes biomas brasileiros, como a Mata Atlântica presente no estado de São Paulo, atualmente re-emergem sob um novo perfil epidemiológico. As leishmanioses são práticos exemplos desse fato, pois está em fase de expansão geográfica, coexistindo dois padrões epidemiológicos distintos, ou seja, casos associados com desmatamento para construções de vias de acesso a novos aglomerados populacionais, esse padrão é caracterizado principalmente pela infecção de qualquer indivíduo presente no local onde há a zoonose. O segundo padrão são as leishmanioses em regiões de antiga colonização, que não está associada ao desmatamento, mas sim aos animais domésticos e peridomésticos, como gatos, gambás, raposas e cães (figura 1) que possuem importante papel como reservatório do protozoário (Neto; Basso; El Kadre 1998).



Figura 1 – Aspectos clínicos da leishmaniose visceral canina. Fotografias de cães, cedidas pela Profa Dra Márcia Dalastra Laurenti, com diagnóstico sorológico e parasitológico encaminhados ao Centro de Zoonoses do município de Araçatuba. A – Perda de peso. B – Onicogribose. C – Lesão cutânea ulcerativa.

A partir da década de 80 novos casos da doença foram notificados, cuja transmissão foi delegada a fatores antrópicos, sem vínculo algum com grande ecossistemas florestais, ampliando então a distribuição espacial da doença e com notificações compulsórias do número de casos.

Uma das principais regiões com um grande aumento do número de casos foi a região de Ubatuba, litoral norte do estado de São Paulo, onde existia apenas casos esporádicos até o ano de 1992, com uma média de dois casos anuais e apresentando um perfil de padrão clássico, ou seja, de homens que adentravam às matas com o objetivo de caçar ou trabalhar. Subseqüentemente, foram notificados 14, 30 e 104 casos no litoral norte do estado de São Paulo nos anos de 1993, 1994, 1995 respectivamente (Sucen, 2003). Nessa nova fase de infecções o padrão clássico, citado acima, não mais ocorreu, ou seja, todas as faixas etárias e ambos os sexos foram atingidos, sugerindo a domesticação dos principais vetores da leishmaniose.

Outra importante região inclusa na zona costeira de São Paulo e que possui sérios problemas com essa doença, é o Vale do Ribeira, que data de 1956 com a descrição dos primeiros casos por Forattini e Oliveira (1957). Atualmente, a região representa uma grande importância epidemiológica, pois em 1993 apresentou cerca de 30% do número total de casos no Estado de São Paulo. De uma forma similar ao do litoral norte, acredita-se que a transmissão ocorra no ambiente extraflorestal, sugerindo novamente a domesticação dos vetores, pois Domingos et al (1998) verificaram uma maior porcentagem de vetores na região do peridomicílio do que em regiões de margem de mata ou mesmo de mata fechada.

Certos fatores mostram extrema importância na distribuição das leishmanioses, um deles é o comportamento vetorial, pois alguns vetores são preferencialmente zoofílicos, tal como o vetor de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, entretanto essa espécie de protozoário está apta a sobreviver em meio ambiente alternativo, apresentando aumento em sua distribuição no território brasileiro. Por outro lado, *Leishmania (Viannia) braziliensis* possui uma vasta distribuição no Brasil, em áreas de colonização antiga onde há grande desmatamento, e sua transmissão está associada com diferentes vetores com distintos comportamentos alimentares (Ministério da Saúde, 1991). Contudo, vale ressaltar que em condições naturais, os insetos distribuem-se em comunidades estáveis

e equilibradas com as variáveis dos ecossistemas como um todo.

Assim, pressupõe-se que o surgimento de muitas epidemias esteja ligado aos problemas de ecologia humana, causados pela introdução acidental ou planejada do homem em regiões onde a presença dos vetores é desconhecida.

1.2 – Ciclo de vida de *Leishmania* sp.

O ciclo de vida do protozoário parasita causador das leishmanioses é considerado digenético (heteroxênico), ou seja, *Leishmania* passa por dois hospedeiros, um invertebrado (Díptera, Psychodidae, Phlebotominae) que pertence ao gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo, e outro hospedeiro vertebrado (Figura 2).

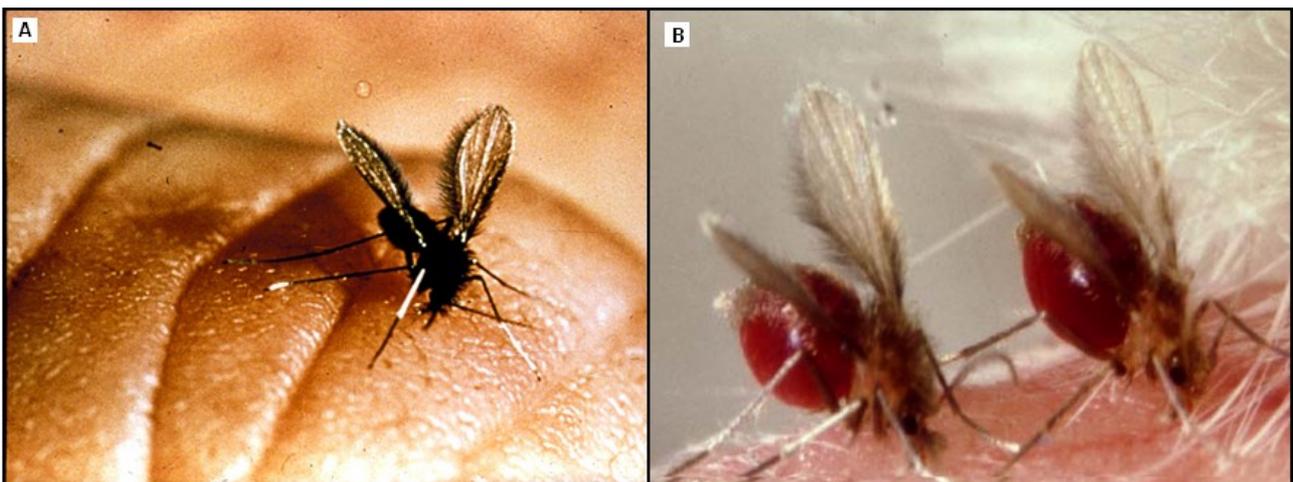


Figura 2 – Flebótomo no momento do repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado. Em A antes do repasto, em B depois do repasto sanguíneo.

O ciclo inicia-se quando o vetor realiza o repasto sanguíneo em um vertebrado infectado, os quais possuem macrófagos como as principais células hospedeiras das formas amastigotas. Como o aparelho bucal de flebotomíneo não é capaz de penetrar nos capilares sanguíneos devido ao seu pequeno tamanho, o inseto hematófago lacera a pele e pequenos capilares sanguíneos, causando uma hemorragia local, assim facilita a ingestão do sangue e outras células presentes na pele, tal como macrófagos e neutrófilos infectados por formas amastigotas. Há que se destacar que na saliva do flebótomo há

potentes peptídeos com ação vasodilatadora (maxadilan) e outras moléculas anticoagulante (Lerner et al 1991). No interior da membrana peritrófica, formada no intestino do inseto e que envolve o bolo alimentar, as formas amastigotas conseguem escapar do interior das células e se diferenciar em formas promastigotas sem capacidade infectiva (também chamada de promastigotas procíclicas) que são capazes de se multiplicarem por fissão binária. Anterior a excreção do bolo alimentar, *Leishmania* deve escapar da membrana peritrófica por ação de quitinases estágio-específicas, pois um dos componentes da membrana peritrófica é a quitina, e se aderir ao epitélio intestinal. Essa adesão evita a excreção do parasita do interior da luz intestinal, assim como possibilita a multiplicação e posterior diferenciação.

A principal molécula responsável pela adesão ao epitélio intestinal é o lipofosfoglicano (LPG), um polímero de unidades repetidas ligadas a uma estrutura de glicano que é inserido à membrana plasmática via âncora 1-0-acil-lisofosfatidil-inositol, que recobre totalmente o parasito como um denso glicocálix (Lodge e Descoteaux 2005). Após 120 a 220 horas (período que depende da interação entre a espécie do vetor e do parasito) da alimentação sanguínea, os parasitos passam por um fenômeno chamado de metaciclogênese, onde há profundas modificações morfológicas, bioquímicas e genéticas, nessa fase as formas promastigotas tornam-se infectivas, sendo então nomeadas promastigotas metacíclicas.

Morfologicamente, as formas metacíclicas são diferenciadas das procíclicas por apresentar um corpo celular afilado e longo, com o flagelo medindo cerca de duas vezes ou mais o comprimento do corpo celular. Em contrapartida formas procíclicas apresentam pequeno corpo celular com um curto flagelo, cerca de uma vez o comprimento do seu corpo celular (Figura 3).

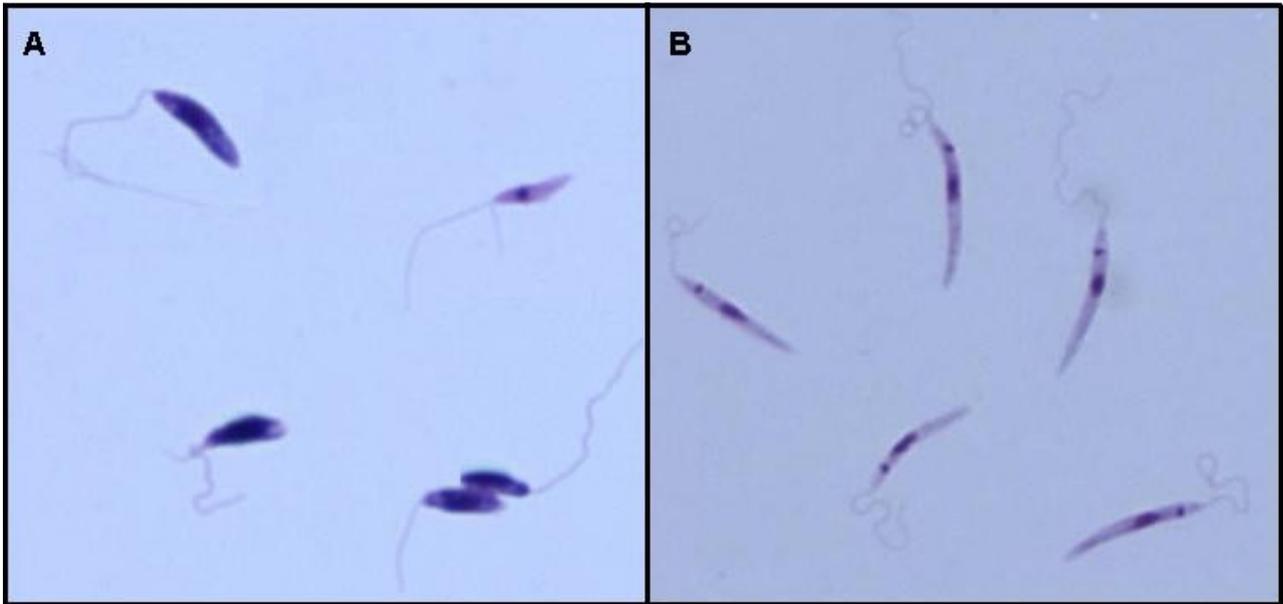


Figura 3 – A imagem A mostra formas procíclicas, onde é possível observar corpo celular e flagelo curtos, algumas formas estão em fissão binária, característico de fase não infectiva (promastigotas procíclicas). Na imagem B é possível observar que as formas metacíclicas são afiladas, com o corpo celular e flagelo longos e possuem longo flagelo, cerca de 2 vezes ou mais o comprimento do corpo celular e não apresentam fissão binária. A espécie em questão é *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Aumento de 400x.

Geneticamente, graças às técnicas de biologia molecular, foi possível verificar que há diferentes genes sendo expressos em estágios infectivos (promastigotas metacíclicas) em relação aos estágios não infectivos (promastigotas procíclicas), como Meta 1 e SHERP (Nourbakhsh et al 1996).

Bioquimicamente, há duas moléculas principalmente estudadas que são a LPG e a metaloproteinase de 63 kDa, também conhecida por gp63 ou MSP (Yao et al 2003). Alguns estudos em relação à gp63 mostram que há um aumento de expressão dessa proteína nos parasitos conforme há um aumento de infectividade (metaciclogênese), estando principalmente relacionada a inativação do complemento, bem como pela sobrevivência dos parasitos intracelulares em estágios recentes de infecção.

Durante a metaciclogênese a LPG sofre modificações estruturais, com aumento do tamanho da LPG e substituições ou modificações na composição de açúcares que formam as unidades repetidas na região terminal da molécula (Figura 4).

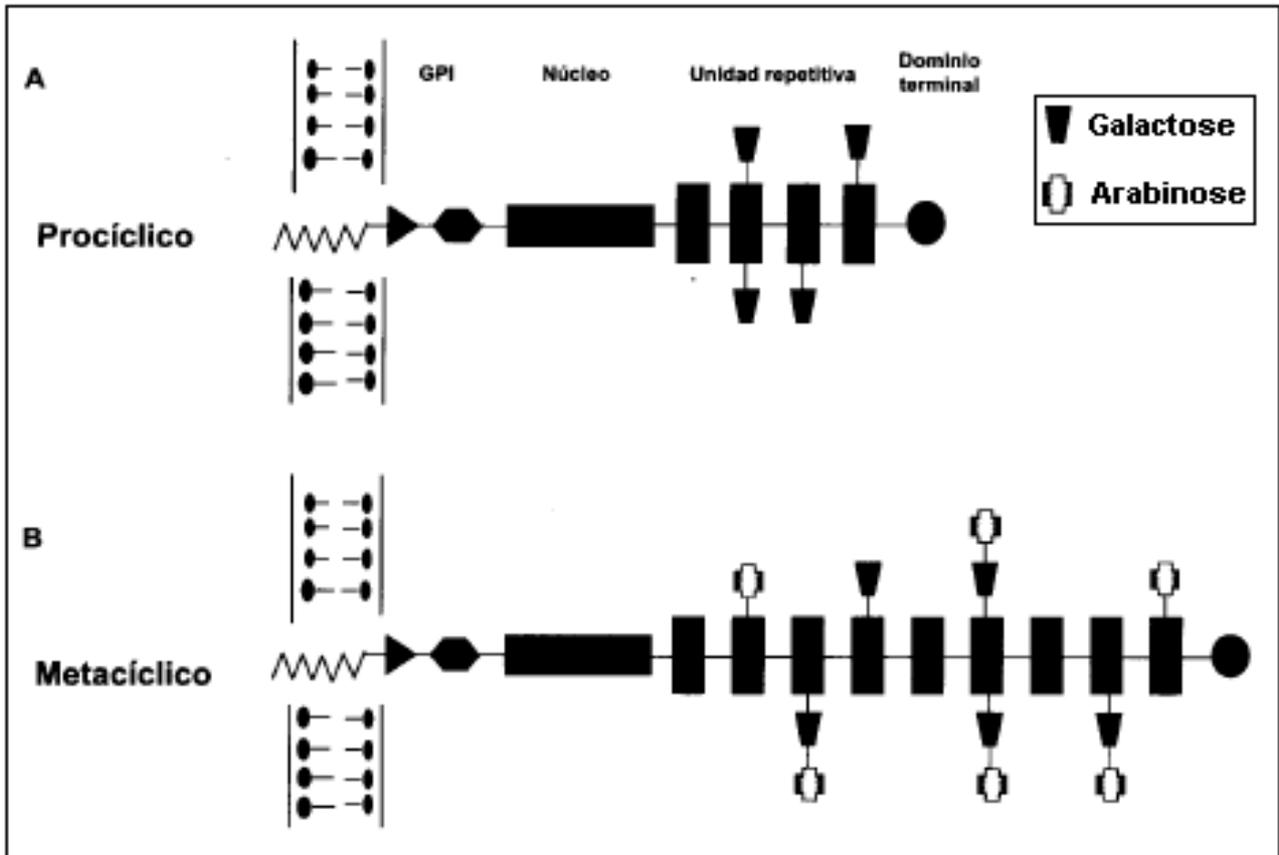


Figura 4 – Comparação da LPG expressa em diferentes estágios de promastigotas de *Leishmania major*. Em A está exemplificada a LPG de uma forma não infectiva (procíclica) apresentando muitos resíduos de galactose. Em B está exemplificada a LPG com algumas substituições dos resíduos de galactose por arabinose, caracterizando assim uma das modificações bioquímicas durante a metaciclogênese. Extraído de Muskus e Villa, 2002.

Essas mudanças bioquímicas na LPG fazem com que o protozoário seja liberado do epitélio intestinal, por uma possível ação de cargas elétricas, e migre para a região da probóscide para ser transmitido a um hospedeiro vertebrado após um novo repasto sanguíneo (Muskus e Villa, 2002). Portanto, após o processo de metaciclogênese as formas metacíclicas serão capazes de infectar um vertebrado durante o repasto. Nesse processo as formas infectivas serão regurgitadas através da probóscide na pele lacerada do vertebrado que contém muitos tipos de células, como macrófagos (histiócitos) que serão as principais células infectadas pelas formas metacíclicas, se transformando em amastigotas principalmente no interior dos macrófagos. A figura 5 generaliza o ciclo de vida digenético de *Leishmania sp.*

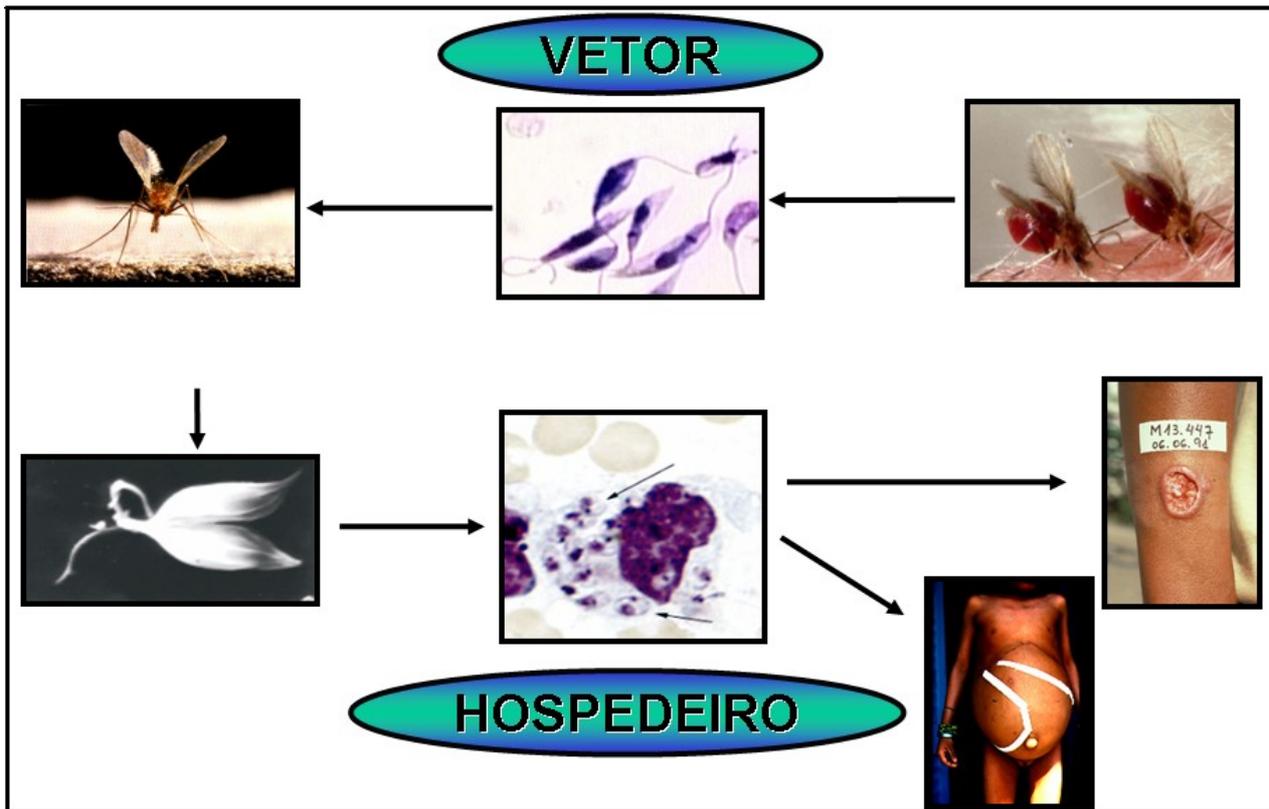


Figura 5 – A figura generaliza o ciclo das leishmanioses. Um indivíduo infectado possui amastigotas no interior de macrófagos, que infectará um flebotomíneo hematófago no momento de seu repasto sanguíneo. As formas amastigotas se transformarão em promastigotas procíclicas e após sucessivas divisões passará por mudanças morfológicas, genéticas e bioquímicas, caracterizando a metaciclôgênese, onde as promastigotas infectivas, estarão aptas a infectar um novo hospedeiro vertebrado, parasitando principalmente as células fagocíticas mononucleares.

Há duas formas básicas de leishmaniose, a primeira é a leishmaniose tegumentar americana, que é sub-dividida nas seguintes formas: cutânea podendo ser causada pelas espécies: *Leishmania (Leishmania) mexicana* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*, a forma mucocutânea, caracterizada por uma ação invasiva e multilante, sendo causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, a forma difusa anérgica, causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *(L.(V.)braziliensis)*. A segunda forma é a visceral, causada pelas espécies *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* no Velho Mundo e nas Américas tal forma é causada por *L.(L.) chagasi* (Figura 6).



Figura 6 – Diferentes formas clínicas da leishmaniose humana. Em A, a chamada Leishmaniose Cutânea Localizada. Em B a chamada Leishmaniose Mucocutânea, com seu aspecto invasivo e mutilante, em C Leishmaniose Difusa Anérgica, em D Leishmaniose Visceral (Kalazar).

O desenvolvimento da doença depende da interação entre alguns caracteres do parasito e do hospedeiro, tal como o potencial evasivo do parasito frente aos caracteres imunopatológicos do hospedeiro.

Quando o parasito atinge a derme do vertebrado, duas principais moléculas superficiais atuam como ligantes aos receptores macrofágicos, a LPG e a gp63. A gp63 tem como papel na infecção inativar o C3 do complemento, à sua forma inativa, o C3bi que funciona como uma opsonina à *Leishmania* facilitando sua ligação ao receptor de complemento 3 (CR 3) dos macrófagos. Essa prévia opsonização dos componentes do complemento ao parasito não elícita a explosão respiratória dessas células e o protozoário é internalizado sem dano algum (Wright e Silverstein, 1983). Há outras vias para entrada na célula hospedeira independente do CR3, através dos receptores de complemento 1, manose-fucose, fibronectina e receptores de macrófagos para produtos finais glicosilados. Para evitar a ligação do complexo de ataque à membrana do hospedeiro, há certos mecanismos evasivos do parasito, como o *Shedding*, tal processo evita a ligação dos componentes líticos do complemento, como o C5b-C9, à membrana do parasito, além desse mecanismo há outras proteínas superficiais responsáveis pela fosforilação desses componentes inativando – os, tal como a proteína quinase de *Leishmania* (figura 7).

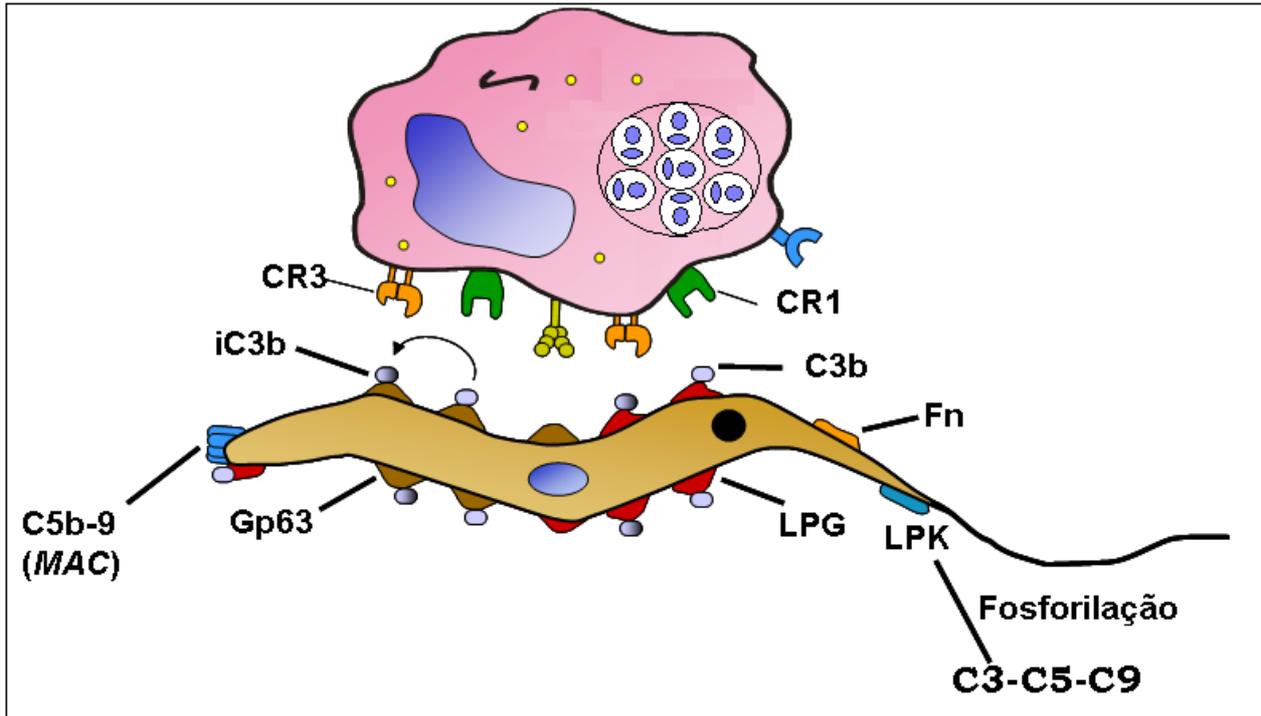


Figura 7 – Moléculas superficiais de promastigotas (gp63) inativa enzimaticamente o componente 3 do complemento à sua forma inativa, o C3bi que opsonizarão as formas promastigotas com consequente internalização em macrófagos. LPG – lipofosfoglicano, gp63 ou MSP – glicoproteína de 63kDa, Fn – Fibronectina, MAC – complexo de ataque à membrana, LPK – proteína quinase; CR1 – receptor de complemento 1; CR3 – receptor de complemento 3.

Após ligação aos receptores e entrada na célula hospedeira, *Leishmania* deve resistir ao meio ácido e rico em proteases do fagolisossomo macrófago. Para isso o parasito lança no vacúolo algumas de suas moléculas superficiais, como a LPG que inibe a ação de radicais hidroxilas e ânions superóxidos que são rapidamente liberados após ativação de NADPH oxidase durante fagocitose. A mesma molécula inibe a fusão fagossomo-endossomo. Esse atraso na biogênese do fagolisossomo é visto como um meio da forma infectante ganhar tempo para se transformar em amastigotas. A gp63, uma protease, apresenta uma maior atividade em pH ácido e neutro e tem a capacidade de proteger os parasitos da citólise intramacrófaga. Há outras proteínas que também estão relacionadas à proteção do parasito contra ação de macrófagos, como a superóxido dismutase, fosfatase ácida e cisteíno proteinases.

Algumas moléculas, como a LPG e a gp63 (não mais expressas em estágios de

amastigotas) e outras proteínas, ao serem liberadas do parasito podem elicitar diferentes tipos de respostas imunológicas através de sua apresentação pelo MHC-II e conseqüente apresentação aos tipos de células T (Scott et al, 1988), ou seja, o antígeno que é liberado do parasito tem a capacidade de direcionar o fenótipo da doença para um perfil autocurável ou a um perfil não curável (Awasthi, et al 2004). O perfil de resolução da doença está diretamente correlacionado às células Cd4⁺ subpopulação Thelper 1 (Th1). Enquanto o perfil de progressão da doença está correlacionado ao perfil Cd4⁺ subpopulação Thelper 2 (Th2).

Quando macrófagos sinalizam o material antigênico dos parasitos à subpopulação Th1, essas são capazes de produzir IFN- γ , IL-2 e TNF- α que levarão à ativação de macrófagos com produção de óxido nítrico (através da óxido nítrico sintase), com conseqüente eliminação das formas amastigotas intracelulares. Quando a apresentação do material antigênico ocorre às células Th2 há produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL10 e IL-13, com íntima associação com a progressão da doença, pois tais citocinas têm como função primordial abolir a função leishmanicida dos macrófagos.

Portanto, a apresentação do antígeno parasitário ao sistema imune é a peça fundamental do quebra-cabeça, pois ele é capaz de dirigir a resposta imune do hospedeiro vertebrado para um perfil de auto-cura ou de progressão da doença. Dessa forma, é primordial o estudo da interação entre proteínas parasitárias e resposta imunológica, pois essa estratégia é uma das principais utilizada por *Leishmania* em sua relação com o sistema imune, além de poder indicar possíveis inibidores que podem ser utilizados como fármacos, visto que a quimioterapia convencional apresenta muitos efeitos tóxicos, como cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e possuem características abortivas (Rath et al, 2003). Em relação a quimioterapia tradicional deve-se destacar a resistência dos protozoários aos medicamentos utilizados (Antimoniais e Anfotericina B) por tratamentos falhos, pois requerem tempo livre do paciente, visto que sua administração necessita de internação por um período mínimo de 48 horas.

Devido à problemática envolvendo as drogas utilizadas na terapia convencional, em 2004, nosso grupo, apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, estudou venenos de serpentes como alternativa para encontrar novas classes de proteínas com atividade anti-leishmania. Para isso, analisou os venenos de três sub-

espécies de cascavéis brasileiras: *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus terrificus*, bem como suas frações protéicas. Nessa análise verificamos que os venenos testados possuíam marcada atividade anti-leishmania, exceto o de *C. d. collilineatus* que de forma antagônica aumentou a concentração de parasitos em cultivo. As análises bioquímicas desse veneno mostraram que havia grandes quantidades de crotoxina, uma proteína dimérica formada pela associação não covalente de uma subunidade ácida, chamada crotopotina e uma subunidade básica, chamada fosfolipase A2 . Tais análises também mostraram que nesse veneno havia pouca quantidade de giroxina e crotamina, duas proteínas com atividade anti-leishmania. Assim, a atividade estimulatória para *L. (L.) amazonensis*, na época correspondente ao projeto, foi atribuída a PLA2, visto que alguns grupos dessa proteína estão envolvidos no crescimento celular (Manguikian e Barbour, 2005), em processos fisiológicos (Weerasinghe et al, 2006) e na via do ácido araquidônico (Erman e Amiram, 1979).

1.3 – Aspectos gerais das PLA2

As PLA2 são classificadas em 12 grupos e alguns subgrupos, porém dois tipos principais são reconhecidos: as citosólicas (cPLA2) possuem altas massas moleculares e estão localizadas no citosol, migram para a membrana perinuclear e outros compartimentos intracelulares das células estimuladas. As secretórias (sPLA2) possuem baixa massa molecular e permanecem estocadas em grânulos celulares e liberadas ao meio extracelular quando são requeridas para uma determinada atividade biológica (Triggiani et al 2005).

Há uma estreita relação entre PLA2 e ciclooxigenase (COX), pois as PLA2 hidrolisam fosfolipídios, na ponte éster da posição 2, gerando ácidos graxos e lisofosfolipídios. A reação da PLA2 é a via primária de liberação de ácido araquidônico (AA) dos fosfolipídios. O AA é precursor dos eucosanóides, como prostaglandinas que são geradas através da reação com a ciclooxigenase (COX), e os leucotrienos, gerados através da lipooxigenase (Balsinde et al 2002).

Diversos estudos mostram que preferencialmente as cPLA2 são responsáveis pela cascata de formação dos eucosanóides, porém algumas sPLA2, pertencentes ao grupo II,

também têm capacidade de gerar esses mediadores da inflamação, que ocorre através da ligação dessas proteínas a receptores de membrana, cuja estrutura é similar ao receptor de manose encontrados em macrófagos (Valentin 2000), após ligação há internalização e conseqüente compartimentalização em grânulos que contém fosfolipídios oxidados e aniônicos, onde ocorre liberação seletiva de AA, cujas enzimas COX1 (enzima constitutiva) ou COX 2 (enzima induzida), formarão prostaglandinas.

Como as PLA2 são enzimas responsáveis por muitos processos fisiológicos, como digestão de presa, defesa e processos envolvidos com a resposta imunológica, o presente trabalho tem como objetivo investigar o papel da PLA2 em infecções experimentais (*in vitro* e *in vivo*) por *L. (L.) amazonensis*, bem como o da crotapotina (cuja associação compõe a fração protéica da crotovina), visto que as PLA2 de serpentes possuem alto grau de similaridade com as presentes em mamíferos além de estarem envolvidas no processo de invasão de alguns parasitos em suas células hospedeiras, como em *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Fracionamento do veneno de *C. d. collilineatus*

O veneno total de *C. d. collilineatus* foi adquirido junto ao Instituto Butantã e SIGMA. Todos os solventes, produtos químicos e reagentes utilizados foram de grau HPLC, grau seqüência ou de alto grau de pureza, foram obtidos da SIGMA, Aldrich Chemicals, Merck e Bio Rad.

2.1.1 - Cromatografia de exclusão molecular

Aproximadamente 25mg de veneno total foram purificados em uma coluna de exclusão molecular em HPLC, usando uma coluna Superdex 75 (1 x 60cm), que foi previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,3M, pH 7,9 durante 120 minutos a um fluxo de 0,3mL/minuto. O veneno total foi dissolvido no mesmo tampão de eluição até sua completa dissolução e as amostras foram clarificadas por ultracentrifugação a 10000 rpm (4500xg). O sobrenadante foi recolhido e aplicado à coluna cromatográfica, previamente equilibrada. A purificação dos componentes do veneno foi realizada usando um gradiente isocrático de eluição com tampão bicarbonato de amônio 0,3M; pH 7,9, com um fluxo constante de 0,3 mL/minuto e o monitoramento da corrida cromatográfica foi realizado a 280nm além do monitoramento da atividade enzimática fosfolipásica A2. As frações coletadas foram liofilizadas e estocadas a – 40°C.

2.1.2 – HPLC de fase reversa

A crotoxina proveniente do primeiro fracionamento foi purificada em HPLC de fase reversa. Nesse protocolo, uma coluna μ -Bonsapack C18 analítica (0,78 x 30 cm) foi previamente equilibrada com tampão A (TFA 0,1% em água Milli Q durante 15 minutos) antes da injeção da solução de crotoxina, que foi preparada a partir de cinco miligramas dissolvida em 250 μ L de tampão. Esta solução foi clarificada usando técnicas de ultracentrifugação. O sobrenadante obtido foi aplicado à coluna cromatográfica e a eluição das amostras foi feita utilizando um gradiente linear de concentração de tampão B (Acetonitrila:tampão A; 2:1 v/v) e o fluxo da eluição mantido a 2,0 mL/minuto. O monitoramento da corrida cromatográfica foi realizado a um comprimento de onda de

280nm de absorvância e o material foi estocado a -40°C

2.1.3 – Eletroforese em PAGE-SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada seguindo-se a metodologia descrita por Laemmli (1970). As placas de poliacrilamida foram feitas de modo descontínuo, apresentando um gel de concentração de 5% e um gel de corrida de 12,5%. As placas foram preparadas utilizando-se uma solução de acrilamida estoque (30%T, 0,9%C). O gel de concentração 5% foi preparado utilizando-se o tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8. O gel de corrida foi feito utilizando-se o tampão Tris-HCl 1,0M, pH 8,8. Em ambos os géis foram acrescentados 0,1% (v/v) de SDS 20%.

A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de mini placas SE 250 Mighty Small II (Hofer Scientific Instruments). As amostras e os marcadores de peso molecular foram dissolvidos em tampão de amostra (Tris-HCl, 0,075M, pH 6,8; 10% de Glicerol; 4% de SDS; 0,001% de Bromofenol). A corrida eletroforética foi realizada a 40 mA. Os géis foram corados com solução de Coomassie Brilliant Blue 0,05% a 37°C e seu excesso foi removido em ácido acético 7%.

2.1.4 - Determinação da Atividade PLA2

A atividade da PLA2 foi medida usando o método descrito por HOLZER & MACKESSY (1996), modificado para um sistema de microplacas de ELISA de 96 poços. Inicialmente foi preparada uma solução mãe de substrato, composta por 3,5mM de ácido 4-nitro-(octanoiloxi) benzóico, dissolvida em acetonitrila pura, com grau de pureza espectroscópico (99,998%), que foi estocada para posterior uso. Solução estoque de enzima feita a partir de 1mg de amostra dissolvida em 1mL de tampão de ensaio (10 mM de Tris-HCl, 10mM de CaCl_2 , 100mM NaCl, pH 8,0). As análises sobre a atividade enzimática foram conduzidas usando-se uma solução com 200 μL de tampão de ensaio, 20 μL de enzima, 20 μL de substrato e 20 μL de água que foram incubadas a 37°C por 20 minutos. A atividade enzimática foi calculada baseada no aumento de absorvância depois de 20 minutos. As placas foram lidas a uma absorvância de 425 nm usando u m leitor de ELISA.

2.2 - Determinação da estrutura primária da PLA2

Cerca de 5,0mg da proteína foi dissolvida em ácido fórmico e adicionados 2 volumes de água Milli-Q resultando em uma concentração final de proteína de 5 a 10mg/mL. Foi então adicionado igual peso de brometo de cianogênio, em frasco lacrado, a temperatura ambiente, por 24h. Após o período foi adicionado 10 a 20 volumes de água Milli-Q e o material foi liofilizado, repetindo-se esta operação por mais uma vez. A proteína liofilizada, reduzida e carboximetilada, foi digerida com duas enzimas: a protease V8 de *Staphilococcus aureus*, por 3h a 37°C com uma razão enzima-substrato de 1:100. Após esse período, a amostra foi liofilizada (Houmard e Drapeau, 1972). A digestão com clostripaína foi realizada por 3h a 37°C. Após interrupção da reação a amostra foi liofilizada. A hidrólise da proteína com tripsina foi realizada em tampão bicarbonato de amônio 0,1M, pH 8.0 e interrompia após 3 horas de reação. As amostras da toxina digerida com clostripaína e com V8 foram repurificadas em HPLC de fase reversa (Water PDA 991 System) usando uma coluna μ -Bondapack C-18. A separação dos peptídeos foi feita com um gradiente de 66% acetonitrila em 0.1% de ácido trifluoracético (tampão B).

2.3 – *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, cepa MHOM/BR/73/M2269 isolada de caso humano de leishmaniose cutânea localizada no Pará, classificada por anticorpos monoclonais e isoenzimas no Instituto Evandro Chagas, Belém, Brasil. Estes parasitos mantidos em pata traseira de camundongos BALB/c foram isolados e expandidos para o meio RPMI 1640 (Gibco - EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (Gibco - EUA), 1% de HEPES (SIGMA) e 1% de antibióticos. Todos os experimentos foram realizados com parasitos com no máximo 3 semanas de isolamento e em fase estacionária.

2.4 – Extração de macrófagos

Camundongos BALB/c foram sacrificados por deslocamento cervical e em cabine de segurança biológica nível 2, foi injetado 5mL de solução fisiológica no peritônio do animal, que foi massageado suavemente. Com equipamentos cirúrgicos estéreis o

peritônio foi aberto, e o lavado peritoneal foi aspirado com pipeta Pasteur e acondicionado em tubos de 15mL que foi centrifugado três vezes, com tampão fosfato pH 7,4 (PBS) estéril, a 1000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Para verificar concentração de macrófagos, as células foram contadas em câmara de Neubauer com auxílio de *Trypan blue* (na diluição de 1:9 – 20µL de *Trypan blue* e 180µL de lavado peritoneal), 50% foram considerados macrófagos, e com auxílio da fórmula de diluição ($C_0 \times V_0 = C_f \times V_f$) os macrófagos foram ajustados na concentração de 10^6 macrófagos/mL e alíquotas de 100µL adicionadas em placa de cultura de 96 poços. Após adicionar as células aos poços, a placa foi imediatamente colocada em estufa a 35°C com 5% de CO₂ por aproximadamente 120 minutos para adesão de macrófagos. Após o período, os poços foram lavados três vezes com PBS a temperatura ambiente para retirar células não aderentes, e adicionado novo meio de cultura (RPMI 1640), após espreiamento, cerca de 12 horas, os ensaios com os macrófagos foram realizados.

2.5 – Ensaio de citotoxicidade

Após adesão e espreiamento de macrófagos, foram adicionadas a PLA2 e a CRP nas seguintes concentrações: 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 32,0 µg/poço. Nos controles foi adicionado PBS. Após 24 horas os poços foram lavados 3 vezes com PBS à temperatura ambiente, sendo então adicionado 20µL de MTT na concentração de 5,0 mg/mL. Após 4 horas foi adicionado SDS com 10% HCl. A placa foi lida após 18 horas em leitor de ELISA em comprimento de onda de 595nm.

2.6 – Atividade da PLA2 em infecção experimental (*in vitro*) de *L.(L.) amazonensis*

Após adesão e espreiamento de macrófagos, o meio de cultura foi trocado e adicionado 10 promastigotas/macrófago. Após 24 horas a placa foi lavada com PBS a temperatura ambiente para retirar parasitos extracelulares. Adicionou-se novo meio de cultura a temperatura ambiente juntamente com alíquotas de PLA2 e CRP nas concentrações: 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 32,0µg/poço, nos controles foi adicionado apenas PBS. Após 24 horas de tratamento com as proteínas, a quantidade de amastigotas foi

avaliada pela técnica ELISA *in situ* (modificado de Piazza et al,1994). Macrófagos previamente infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com PLA2 ou CRP, foram fixados com metanol durante 10 minutos. Após esse período foram lavados três vezes com PBS com 0,05% de tween 20 (PBST). Para evitar ligações inespecíficas, as células foram bloqueadas com leite desnatado por 120 minutos em estufa a 37°C. Após o período, foram lavadas três vezes com PBST e então adicionado soro hiper-imune como anticorpo primário (anti-leishmania) de paciente com leishmaniose tegumentar americana, na diluição de 1:100 em PBST durante 45 minutos a 37°C. Após esse período, a placa foi lavada três vezes com PBST e então adicionado o anticorpo de cabra anti-IgG humana (SIGMA A 3150) conjugado com fosfatase alcalina na diluição de 1:1000 em PBST por 45 minutos a 37°C. A placa então foi lavada novamente e adicionado substrato cromogênico p-nitrofenil fosfato - p-NPP - (SIGMA N9389) dissolvido em tampão carbonato 0,1M pH 9,6. A placa foi lida em leitor de ELISA em comprimento de onda de 405nm.

2.7 – Utilização de inibidores na infecção experimental (*in vitro*)

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram tratadas com Indometacina e Dexametasona na concentração de 10µg/mL por um período de 24 horas. Após esse período os parasitos foram lavados três vezes a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C em PBS. Tais promastigotas foram utilizadas para infectar macrófagos e após 24 horas foi realizado o ELISA *in situ* (item 2.6).

2.8 – Testes para avaliação da metaciclogênese

2.8.1 - Tratamento das promastigotas com PLA2

Promastigotas no 5º dia de cultura foram centrifugadas inicialmente a 1000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi recolhido e novamente centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. Após centrifugação, as promastigotas foram contadas e sua concentração ajustada para 10⁶ promastigotas/mL. Alíquotas de 32,0µg/mL de PLA2 e da CRP foram adicionadas à cultura. Após 72 horas foram realizadas contagens na cultura de parasitos com câmara de Neubauer para verificar atividade das proteínas nas formas promastigotas. Após contagem, os parasitos foram ajustados a uma determinada

concentração para realização dos experimentos listados abaixo.

2.8.2 - Resistência à lise por soro humano

Soro humano colhido de doador saudável e sem ter ingerido medicamento algum em um período de pelo menos 96 horas foi utilizado. O sangue foi mantido à temperatura ambiente por 1 hora para retração de coágulo. Posteriormente foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos e o soro foi colhido em meio estéril. Promastigotas tratadas com PLA2 e CRP, foram centrifugadas 3 vezes a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C com PBS estéril e a concentração ajustada para 10^5 promastigotas/poço. Foram feitas diluições de soro em PBS nas seguintes proporções: 1:32; 1:64 e 1:128 e as promastigotas foram incubadas por um período de 45 minutos à 35°C. Após o período, foram realizadas contagens em câmara de Neubauer para verificar resistência das promastigotas frente à lise por soro humano. Concomitantemente foi montado um experimento padrão com promastigotas recém isoladas, no 2º dia de cultura para verificar perfil de sensibilidade às diferentes concentrações de soro.

2.8.3 – Quantificação de proteínas

Promastigotas tratadas com PLA2 e CRP por um período de 72 horas, foram centrifugadas 3 vezes com PBS estéril a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C e a concentração ajustada para 10^6 promastigotas/mL. Aos *pellits* foi adicionado 1mL de água destilada e procedeu-se ao congelamento e descongelamento das amostras por três vezes para se obter o extrato total das promastigotas. Para realização do experimento foi utilizado como padrão albumina bovina (BSA) a 1,0 mg/mL solubilizada em água destilada. A concentração de padrão, para o teste, estava na faixa de:0 a 100µg/mL. Os extratos de promastigotas tratadas e controle não foram diluídos. Às diluições de albumina e aos extratos dos grupos tratados e controle foram adicionados 2 mL de solução reativa (30 mL de solução de carbonato de sódio 3% em hidróxido de sódio 0,1M; 300 µL de solução de tartarato de sódio e potássio 4% e 300 µL de solução de sulfato de cobre 2%) e incubado por 10 minutos. Após o período foi adicionado em cada amostra 200 µL de solução Folin-Cicateau por 30 minutos. Posteriormente, alíquotas de 200 µL foram

adicionadas a placas de 96 poços e lidas a 595 nm.

2.8.4 - Morfometria

Para estudar a morfometria dos parasitos tratados com as diferentes proteínas, foi usada a metodologia descrita por Spath e Beverley (2001). Após a separação das formas infectantes das não infectantes com gradiente de ficoll, os parasitos foram centrifugados três vezes com a 3000rpm por 10 minutos a 4°C em PBS e uma alíquota da solução de parasitos foi adicionada a lâmina, fixada e corada com Giemsa. A morfometria foi então analisada através de analisador de imagens acoplada a microscópio.

2.9 – Atividade fosfolipásica A2 em promastigotas

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* no 5º dia de cultura foram centrifugadas três vezes a 3000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi colhido e estocado a –80°C para liofilização. Ao pellet, uma amostra contendo $5,0 \times 10^8$ promastigotas/mL, foi adicionado 1 mL de água milli-Q, que foi submetido ao congelamento e descongelamento por três vezes. Posteriormente a amostra foi submetida à liofilização, seguido por ressuspensão em 1mL de água milli-Q para realizar a quantificação de proteínas pelo método de Lowry (descrição no item 2.7.3). Para verificar a atividade fosfolipásica A2 foi feita uma reação contendo 200µL de tampão de ensaio (Tris-HCl 0,1M; CaCl₂ 2mM; NaCl 0,15M; pH 7,8), 20 µL das amostras (20µg de proteína), 20 µL de água e 20 µL de substrato, totalizando 260µL (similar ao item 2.1.4). Todas as amostras foram esterilizadas em membrana 0,22µm.

Para os testes de inibição foram utilizados os seguintes inibidores: para-bromofenacil bromídeo (p-BPB) a 0,1mM, Indometacina (10µg) e Dexametasona (10µg). Para esses testes foram utilizados com um volume final de 260µL.

Todas as amostras foram incubadas a 35°C por um período de 40 minutos, onde a absorbância foi lida em um comprimento de onda de 405nm. Os resultados são expressos em nmol/min/mg de proteína.

2.10 – Infecção *in vivo*

Para esse experimento foram montados 3 grupos experimentais contendo 4 camundongos BALB/c isogênicos com 6 semanas de vida, obtidos do centro de bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Promastigotas controle e tratadas com PLA2 e CRP por 72 horas, foram centrifugadas três vezes em PBS a 3000rpm por 10 minutos a 4°C e sua concentração ajustada para 2×10^7 promastigotas/mL. Para a infecção, os animais foram anestesiados com uma solução de tiopental contendo 1mg/200 μ L e cerca de 50 μ L de solução contendo promastigotas tratadas e controles foram injetados na pata traseira direita de cada animal. A intervalos regulares de 5 dias foi medido edema da pata e contra pata de cada animal com um micrômetro, verificando assim o edema devido à infecção.

2.11 – Análises histológicas

Após 40 dias de infecção experimental, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. As biópsias foram colhidas da pata onde a solução de parasitos foi inoculada. Os materiais foram incluídos em bloco de parafina, onde foram realizadas secções de 4 μ m e realizada coloração de HE (Hematoxilina/Eosina) para cada animal dos grupos experimentais. Para análise de imunohistoquímica, as lâminas foram desparafinizadas em xilol por 15 minutos à temperatura ambiente, logo após foram hidratadas passando por cubas de álcool absoluto, 70%, 50%, 30% e água, seguido por recuperação antigênica com tampão citrato 10mM, pH 6,0 a 95°C por 30 minutos em banho – maria, seguido de 20 minutos para resfriamento, cerca de 50°C. As lâminas foram retiradas do tampão citrato e foram feitas 6 incubações de 5 minutos em peróxido de hidrogênio 3% para bloqueio da peroxidase endógena. Para bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado uma incubação com leite desnatado (Molico-Nestlè) por 1 hora a 37°C. Posteriormente, adicionou-se ao tecido anticorpo policlonal anti-leishmania a uma diluição de 1:800 em PBS com 1% de BSA por 2 horas a 37°C. Em seguida as lâminas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com PBS com 0,05% de Tween 20 (PBST), em seguida, adicionou-se o anticorpo secundário biotilado (Biotinylated link – Dako K-0690) e incubou-se por 1 hora a 37°C. Foram feitas 3 lavagens de 5 minutos com PBST. Após lavagens, adicionou-se estreptavidina conjugada a peroxidase (Streptavidin – HRP - Dako

K-0690) e incubou-se por 45 minutos a 37°C. Após esse período foram feitas 3 lavagens com PBST por 5 minutos, seguido por incubação por 5 minutos a temperatura ambiente com uma solução de diaminobenzidina (DAB – Sigma D 8001) 0,6mg/mL com 0,03% de peróxido de hidrogênio em PBS. A reação foi interrompida pela adição de água destilada, sendo em seguida lavadas com água destilada para retirar o excesso da solução de DAB. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto a temperatura ambiente, sendo lavadas com água corrente e desidratadas para montagem com permount. Posteriormente, foram feitas contagens em 10 campos da lâmina com auxílio de analisador de imagens para se calcular a densidade de amastigotas e de células inflamatórias.

2.11 – Outro modelo experimental

2.11.1 – *Trypanosoma cruzi*

Epimastigotos de *T. cruzi* (cepa Y) mantidas em meio Lit a 28°C (Sadigursky & Brodskyn, 1986), foram centrifugados três vezes a 4000 rpm durante 10 minutos. Após centrifugação os epimastigotos foram ajustados para uma concentração de 10^7 epimastigotos/mL. Alíquotas de 100 μ L da suspensão de epimastigotos foram adicionadas em placas de cultura com 96 poços. Imediatamente após o plaqueamento, alíquotas de PLA2 foram adicionadas aos poços nas seguintes concentrações: 1,0; 2,0; 4,0, 8,0, 16,0 e 32,0 μ g/poço. Após 24 horas, foi verificada a viabilidade dos epimastigotos pela adição de 20 μ L de MTT a 5,0mg/mL por um período de 4 horas, quando então foi adicionado SDS a 20%. Após quatro horas a placa foi lida em leitor de ELISA a 595nm. Alternativamente, epimastigotos foram centrifugados três vezes a 4000 rpm durante 10 minutos. Após centrifugação os epimastigotos foram ajustados para uma concentração de 10^6 epimastigotos/mL, e tratados com concentrações de 8,0 ;16,0 e 32 μ g/mL. A períodos regulares de 24 horas, durante 72 horas, foram realizadas contagens em Câmara de Neubauer.

2.12 – Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. Para as análises histológicas,

foram contados 100 campos diferentes nas biópsias dos grupos experimentais contendo 4 animais. Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratados foram verificados através do teste t-Student e os dados apresentados são considerados significativos estatisticamente.

3 - RESULTADOS

3.1 – Fracionamento do veneno de *C. d. collilineatus* e atividade fosfolipásica

A2

O veneno aplicado à coluna cromatográfica de exclusão molecular, permitiu a eluição de quatro principais picos protéicos, onde o pico em vermelho foi positivo para atividade fosfolipásica A2 (figura 8), o pico em questão é a crotoxina, principal constituinte protéico encontrado nesse veneno, pois apresentou cerca de 60% do veneno total, tal valor foi estimado pela integração do pico em vermelho, e corroborada posteriormente com a massa liofilizada da fração protéica.

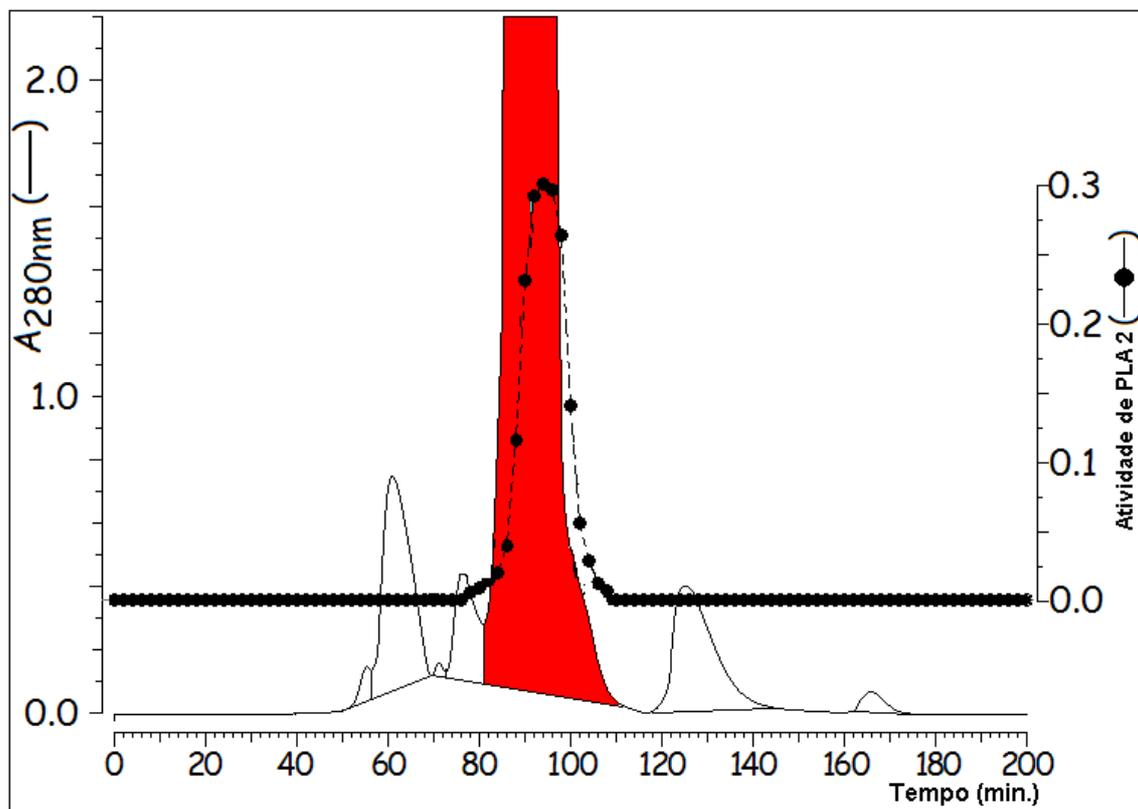


Figura 8 – Perfil da cromatografia de exclusão molecular do veneno total de *C. d. collilineatus*. Nesse veneno há cerca de 4 picos protéicos principais. O pico em vermelho, correspondente a crotoxina, foi encontrada atividade fosfolipásica A2.

A crotoxina isolada do veneno total aplicada a HPLC de fase reversa para isolamento da PLA2 e da CRP (figura 9).

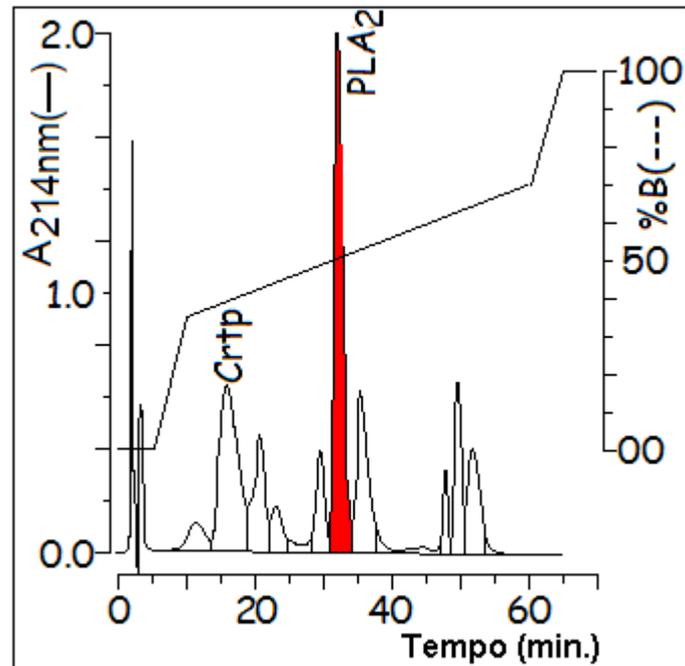


Figura 9 – A crotoxina, eluída na cromatografia de exclusão molecular, foi re-eluída em cromatografia de fase reversa para fracionamento da PLA2 e CRP. O teste enzimático mostra que a fração de interesse é a PLA2 (em vermelho), e foi eluída próximo aos 30 minutos.

Através do perfil eletroforético, observamos que o fracionamento da PLA2 e da CRP foi realizado com alto grau de pureza (figura 10), onde a massa molecular da PLA2 foi estimada em aproximadamente 15kDa e da crotopotina em 9kDa.

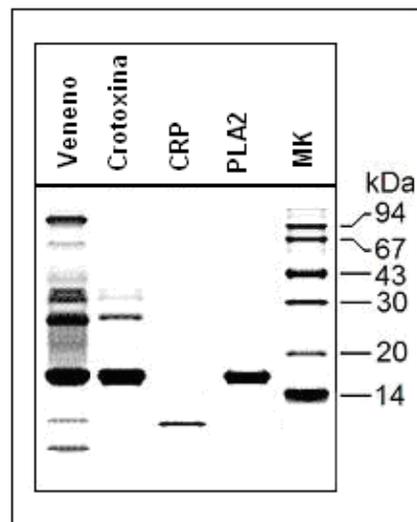


Figura 10 – Perfil eletroforético do veneno total, crotoxina, CRP e PLA2, mostrando que o fracionamento foi realizado com alto grau de pureza. MK – Marcadores moleculares.

3.2 - Determinação da estrutura primária da PLA2

Peptídeos foram obtidos a partir de digestão específica, com a protease V8 e clostripaína, em seguida, foram adicionadas ao seqüenciador automático. A seqüência obtida, contendo 122 aminoácidos foi: HLLQFNKMIKFETRRNAIPFYAFYGCYCGWGGRGRPKDATDRCCFVHDCCYGKLTGCN YKWDIYTYSLRSGYIVCGKGTPEKQICECDRVAECLRRSLSTYRYKYMLYPDSRCRQ PSETC (figura 11). Para verificar identidade com outras proteínas crotálicas foi realizada uma busca nos seguintes bancos de dados: *Swiss Prot* e *Blast*. Para verificar identidade entre a seqüência adquirida e PLA2 de mamíferos, foi feito levantamento bibliográfico e três seqüências de PLA2 foram utilizadas a fim de comparações com a proteína obtida (Ishizaki et al 1989; Mulherkar et al 1993).

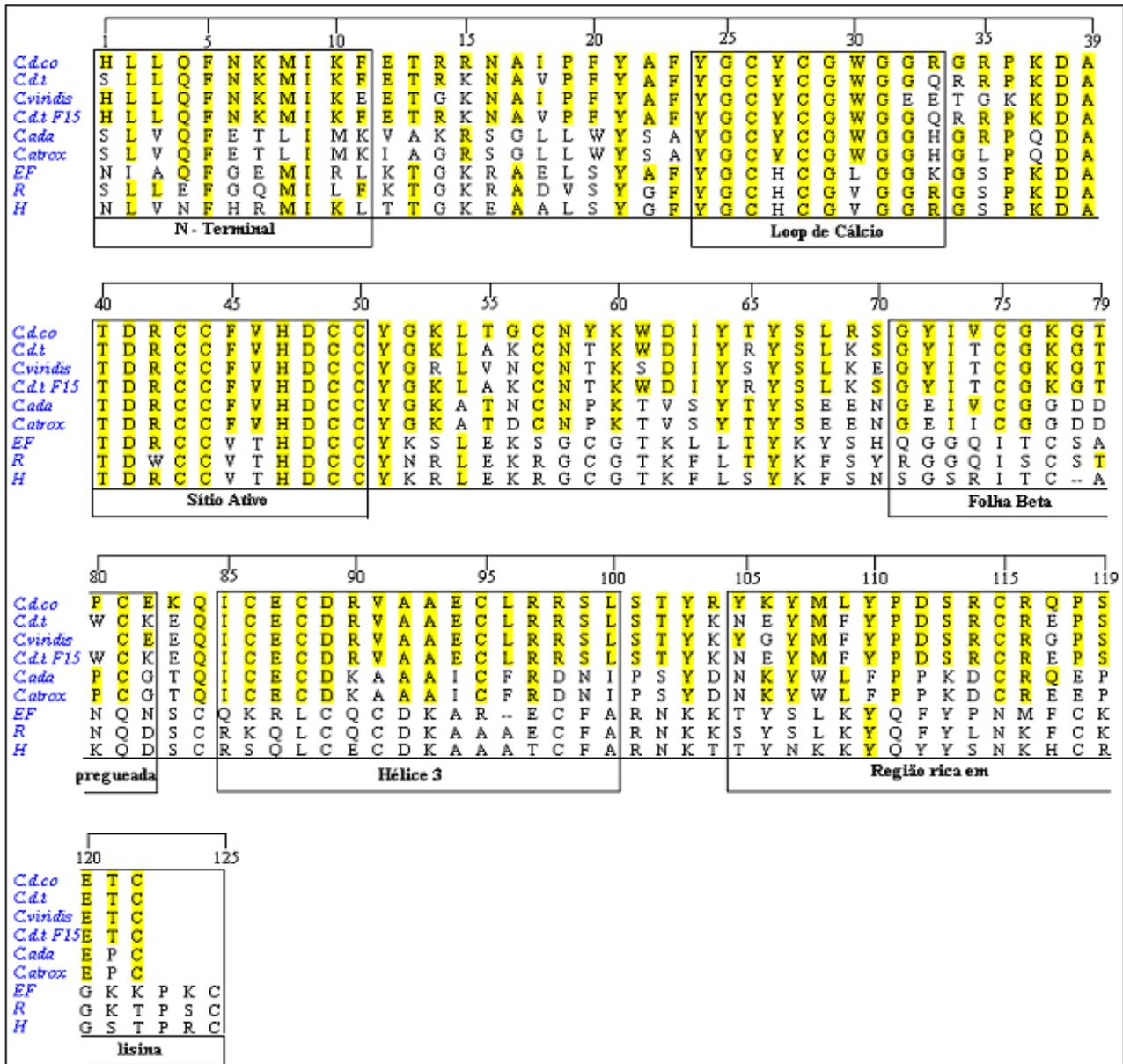


Figura 11 – Através da análise das diferentes seqüências verifica-se diferenciados graus de identidade entre as PLA2 crotálicas e de mamíferos, algumas regiões, como o sítio ativo são altamente conservadas entre as espécies. *C.d.colli* (*C.d.collilineatus*); *C.d.t* (*C.d.terrificus*); *C.viridis*; *C.d.t. F15* (isoforma básica de *C.d.terrificus*); *C.ada* (*C.adamanteus*); *C.atrox*; *EF* (*Enhancing factor* – PLA2 isolada de intestino de ratos); *R* (PLA2 de plaqueta de rato); *H* (PLA2 do líquido sinovial humano).

A figura indica regiões na proteína que são altamente conservadas nas diferentes espécies animais. Na região N-terminal, as PLA2 de *C.d.t*, *C.viridis* e *C.d.t F15* apresentam identidade entre 90 a 100% com a PLA2 de *C. d. collilineatus*, contudo *C.ada* e *C.atrox* apresentam uma pequena identidade, cerca de 36%. A PLA2 nomeada R

(fosfolipase A2 de plaqueta de ratos) apresenta cerca de 54% de identidade, na mesma região, à PLA2 de *C. d. collilineatus*. A região denominada Loop de Cálcio é altamente conservada em todas as seqüências protéicas analisadas, onde a identidade varia entre 90 a 70% entre as seqüências. Na região denominada Sítio Ativo as PLA2 crotálicas são 100% idênticas. Nessa mesma região as PLA2 de mamíferos também são idênticas a de *C. d. collilineatus*, a EF (*Enhancing factor*), isolada de intestinos de ratos e H (PLA2 de líquido sinovial humano), apresentam cerca de 80% de identidade. A proteína denominada R apresenta cerca de 72% de identidade. A tabela I sumariza os diferenciados graus de identidade encontrados entre as PLA2.

Tabela I – A tabela I mostra os diferenciados graus de identidade entre as PLA2 crotálicas e de mamíferos, todas pertencentes ao grupo II, caracterizadas como secretórias e de baixa massa molecular.

Região	<i>C.d.t</i>	<i>C.viridis</i>	<i>C.d.t F15</i>	<i>C.ada</i>	<i>C.atrox</i>	<i>EF</i>	<i>R</i>	<i>H</i>
N terminal	100%	100%	100%	36%	36%	36%	54,4%	45,5%
Loop de Ca⁺²	90%	80%	90%	90%	90%	70%	80%	80%
Sítio Ativo	100%	100%	100%	100%	100%	81,8%	72,7%	81,8%
Folha β	75%	83,3%	75%	58,3%	50%	0	8,3%	0
Hélice 3	100%	100%	100%	56,25%	56,25%	0	0	0
Região Rica em Lisina								
em Lisina	83,3%	83,3%	77,8%	50%	66,7%	5,5%	5,5%	5,5%

As regiões hipervariáveis entre a PLA2 de *C.d.co* e as de mamíferos são: Folha β, Hélice 3 e a região rica em lisina. Entre as próprias proteínas crotálicas essas regiões também são hipervariáveis, pois apresenta graus de identidade oscilantes entre as espécies (como no caso da região N-terminal de *C.atrox* e *C.d.co*) e entre as subespécies (como no caso da região da folha β de *C.d.t* e *C. d. collilineatus*).

3.3 – Ensaio de citotoxicidade

Através de ensaio de citotoxicidade, verificou-se que a PLA2 e CRP não possuem atividade citotóxica a macrófagos peritoneais nas concentrações testadas (Figura 12), pois é possível verificar que com o aumento das concentrações de proteínas adicionadas

ao meio de cultura a curva permanece constante.

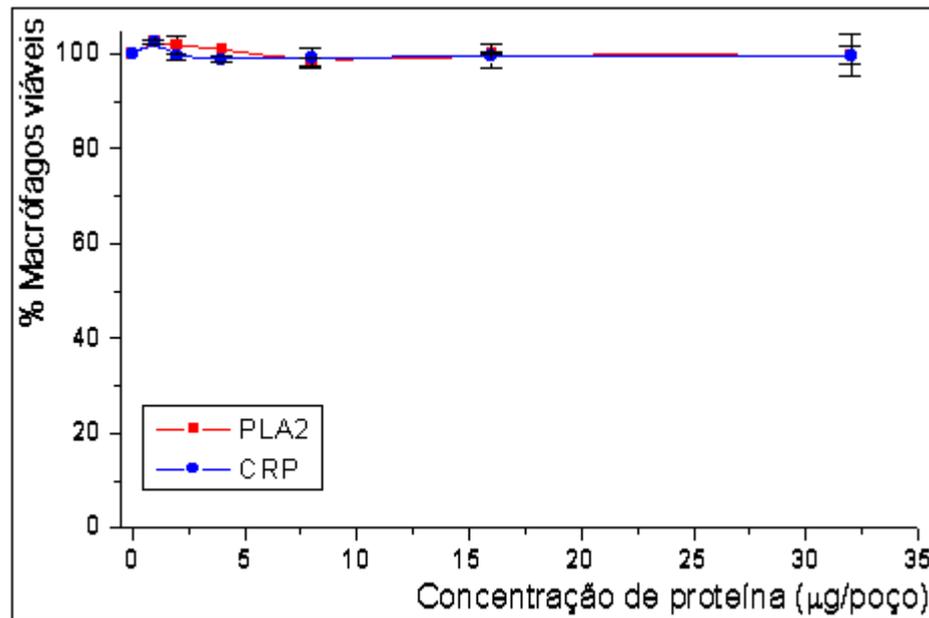


Figura 12 – A PLA2 e CRP não apresentaram atividade citotóxica a macrófagos peritoneais, nas concentrações testadas. No gráfico é possível verificar que conforme foi aumentada a concentração da PLA2 e CRP, a porcentagem de macrófagos viáveis permaneceu constante. Tais resultados são expressos como média±desvio padrão (N=3; p=0,01)

3.4 - Atividade da PLA2 e da CRP na infecção experimental (*in vitro*) de *L.(L.) amazonensis*

Após tratamento de macrófagos infectados foi realizada a técnica ELISA *in situ*. De acordo com os nossos dados experimentais, a PLA2 causou aumento no número de amastigotas em todas as concentrações de PLA2 utilizadas, pois houve um marcado aumento da absorbância (Figura 13).

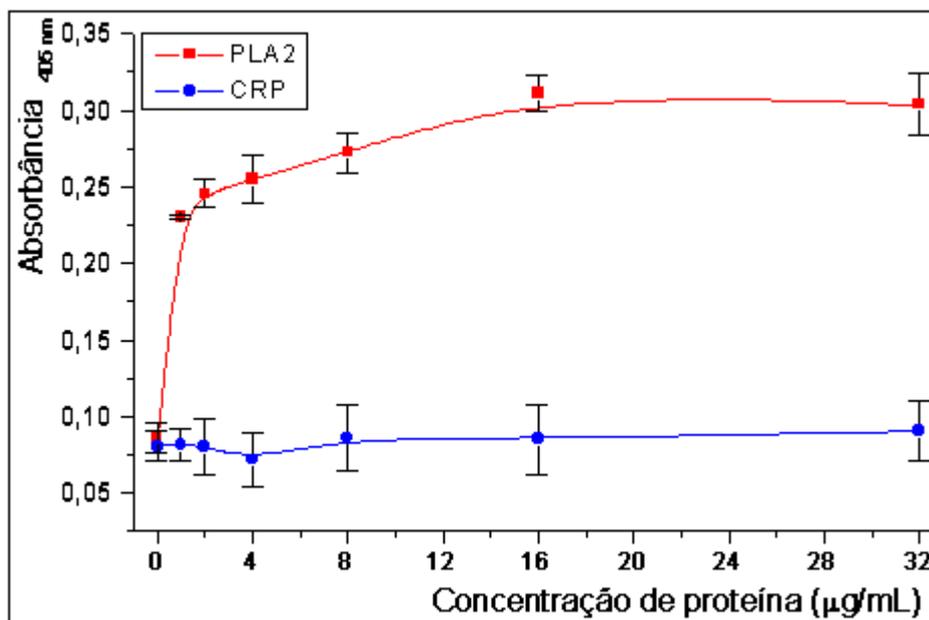


Figura 13 – O tratamento de PLA2 em macrófagos previamente infectados com *L. (L.) amazonensis* causou marcado aumento do crescimento das formas amastigotas, entretanto nas menores concentrações observou-se uma maior taxa de crescimento. A CRP nessa análise experimental não causou efeito algum na cultura celular. Tais resultados são expressos como média±desvio padrão (N=3; p=0,01).

É possível ainda verificar que o maior aumento mais marcante ocorreu quando macrófagos previamente infectados foram tratados com as menores concentrações da PLA2. Nas maiores concentrações utilizadas a curva tende a uma estabilização, entretanto o crescimento ainda é observado. Diferentemente da PLA2, o tratamento da CRP em macrófagos infectados não causou efeito algum como é possível verificar na estabilização da curva com as diferentes concentrações de CRP.

3.5 – Atividade fosfolipásica A2 em promastigotas

Para verificar se promastigotas de *L. (L.) amazonensis* possuíam PLA2 realizamos teste enzimático para PLA2 no sobrenadante e em lisado de tais formas.

Após 40 minutos de incubação com substrato específico a 37°C foi observado que o sobrenadante de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* apresentou a maior atividade específica para PLA2, aproximadamente 3 vezes maior que a atividade presente no lisado dos parasitos (Figura 14A), o lisado apresentou a menor atividade específica

(Figura 14B).

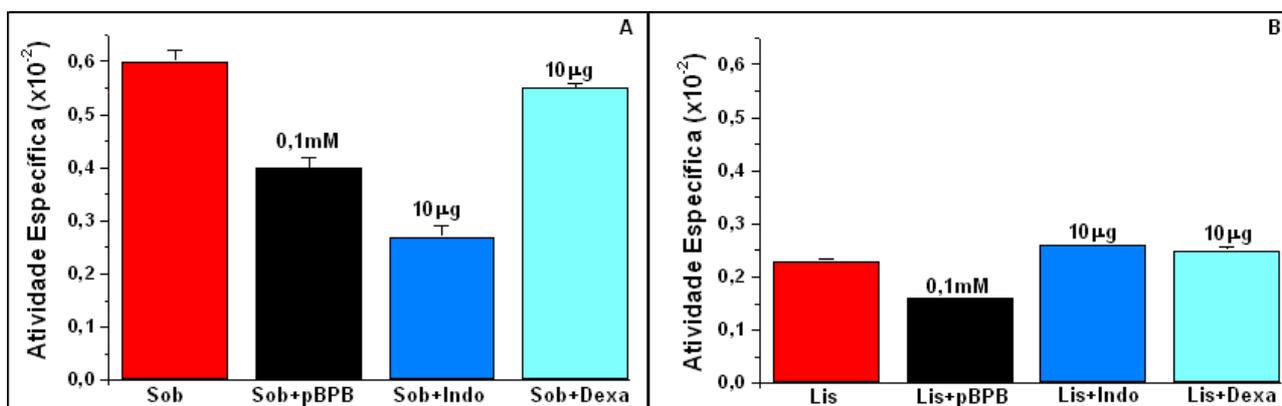


Figura 14 - A imagem A mostra a atividade fosfolipásica A2 do sobrenadante de promastigotas. Em tal análise foi observado que a Indometacina apresentou a melhor atividade inibitória, seguido pelo pBPB, entretanto, a Dexametasona não apresentou atividade inibitória alguma. A imagem B mostra a atividade fosfolipásica A2 do lisado, tal análise mostra que o pBPB foi capaz de inibir a atividade fosfolipásica A2 do lisado. Tais resultados são expressos como média±desvio padrão (N=3; p=0,01).

Em relação à inibição da atividade fosfolipásica A2 do sobrenadante, os melhores inibidores foram a Indometacina, com aproximadamente 55% de inibição, o pBPB apresentou cerca de 33% de inibição, a Dexametasona apresentou aproximadamente 8,3% de inibição, a menor atividade inibitória entre os inibidores. Em relação ao lisado de parasitos foi verificado que o pBPB foi capaz de inibir a atividade fosfolipásica dos parasitos em aproximadamente 30%, entretanto a Indometacina e a Dexametasona não foram capazes de inibir a atividade fosfolipásica A2 do lisado, inclusive aumentaram a atividade enzimática fosfolipásica A2.

3.6 – Uso de Indometacina e Dexametasona na infecção experimental (*in vitro*)

Para verificar se o uso de Indometacina ou Dexametasona poderia diminuir o grau de infecção (por uma possível inibição da PLA2 dos parasitos), os protozoários foram tratados por 24 horas com tais inibidores e posteriormente tais parasitos foram adicionados à cultura de macrófagos.

Essa análise mostrou que tais inibidores não foram capazes de inibir a entrada e

conseqüente crescimento dos parasitos no interior de macrófagos (Figura 15).

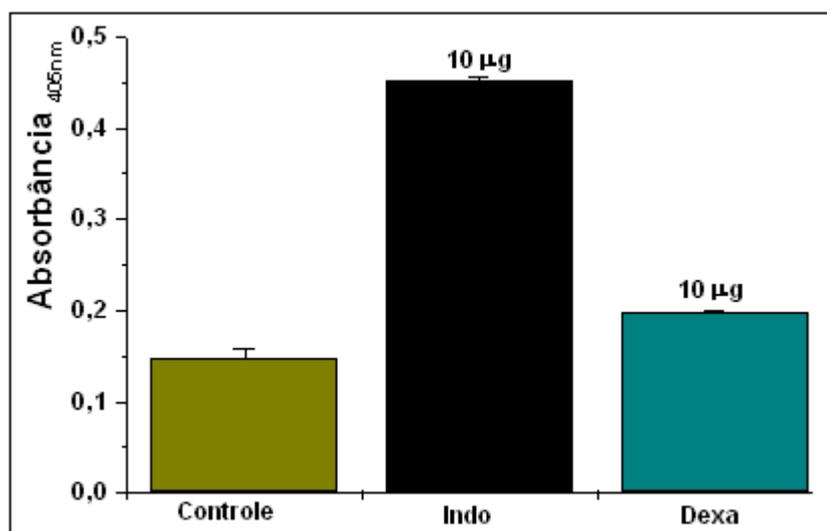


Figura 15 – A imagem mostra que a Indometacina e Dexametasona não foram capazes de inibir a entrada e conseqüente crescimento de parasitos no interior dos macrófagos. Tais resultados são expressos como média±desvio padrão (N=3; p=0,01).

Diferentemente do esperado, a Indometacina causou acentuado crescimento dos parasitos no interior dos macrófagos, cerca de 3 vezes maior que o controle, a Dexametasona apresentou similar perfil, entretanto o aumento foi menor, cerca de 0,8 vezes o valor do grupo controle. O uso de pBPB, nessa análise, não foi possível, pois seu diluente era dimetil sulfóxido (DMSO) que é extremamente danoso a muitas linhagens celulares, inclusive de *Leishmania*.

3.5 – Testes para avaliação da metaciclogênese

3.5.1 - Tratamento das promastigotas

Após tratamento de promastigotas com uma concentração de 32,0µg/mL de PLA2 e CRP, foi realizada contagem em câmara de Neubauer, onde foi verificado que a proteína que causou maior porcentagem de crescimento foi a PLA2, cerca de 50%, entretanto a CRP causou uma diminuição no número de promastigotas em 50% na mesma concentração testada para PLA2 (figura 16).

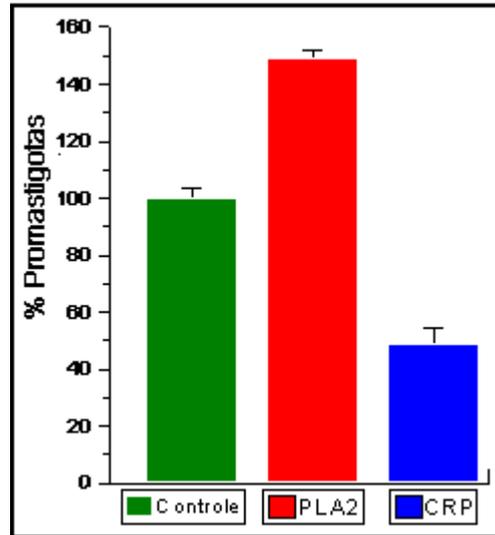


Figura 16 – A PLA2 causou um aumento no número de promastigotas em aproximadamente 50%, entretanto a CRP causou uma diminuição do número de promastigotas de cerca de 50%. Tais resultados são expressos como média±desvio padrão (N=3; p=0,01).

3.5.2 - Resistência à lise por soro humano

Promastigotas tratadas com o VT, CTX, PLA2 e CRP foram incubadas com soro humano nas seguintes porcentagens: 0,78; 1,56 e 3,12. Após 45 minutos foi verificado que não havia diferenças significativas entre os grupos tratados com PLA2 e CRP e o grupo controle (Tabela II).

Tabela II – Promastigotas tratadas com PLA2 e CRP não mostraram diferenças significativas em relação ao grupo controle ou à cultura de promastigotas no 5º dia de cultura, entretanto, os grupos tratados e controle mostraram maiores porcentagens de sobrevivência em relação à cultura no 2º dia de cultura. Tais resultados são expressos como média±desvio padrão (N=3; p=0,01)

	0,78% de soro	1,56% de soro	3,12% de soro
Promastigotas 2º dia de cultura	21,78 ± 2,80	7,92 ± 0	0
Promastigotas 5º dia de cultura	92,05 ± 8,95	53,84 ± 7,25	36,18 ± 6,47
PLA2	97,39 ± 3,05	66,20 ± 7,07	32,50 ± 5,07
CRP	100,00 ± 0	55,23 ± 7,07	29,21 ± 7,07
Controle	102,50 ± 2,50	65,23 ± 5,05	37,25 ± 5,10

Todos os grupos mostraram uma sensibilidade dependente da porcentagem de soro usado. As análises mostram que promastigotas no 5º dia de cultivo incubadas com as mesmas porcentagens de soro humano apresentavam taxas de sobrevivência similares aos dos grupos tratados, e que promastigotas no 2º dia de cultivo foram mais sensíveis nessas mesmas porcentagens. A concentração média de soro que causou lise em 50% das populações tratadas e controle foi de aproximadamente 1,35%. Na faixa de teste, as promastigotas do 2º dia de cultura não apresentaram 50% de lise, pois foram altamente sensíveis às menores concentrações utilizadas.

3.5.3 – Quantificação de proteínas

Proteínas totais de lisado de promastigotas foram quantificadas pelo método de Lowry. Através de nossas condições experimentais, verificamos que não houve diferenças significativas entre os grupos tratados e grupo controle na expressão protéica (Tabela III).

Tabela III – Quantificação de proteínas pelo método de Lowry. Os dados mostram que não há diferenças significativas da quantidade de proteínas entre os grupos tratados e controle. Tais resultados são expressos como média±desvio padrão (N=3; p=0,01).

Grupo	Quantidade estimada de proteína (µg/µL)
VT	4,10 ± 0,42
CTX	3,21 ± 0,19
PLA2	4,08 ± 0,45
CRP	3,45 ± 0,20
Controle	3,03 ± 0,52

3.5.4 – Morfometria

Para esse experimento foram utilizados parasitos no 2º e no 6º dia de cultura. Através da análise de 100 promastigotas foi verificado que havia diferenças significativas entre o corpo celular, flagelo e largura de culturas infectivas e não infectivas (Tabela 1). Foi verificado que a maior parte das promastigotas com características infectivas foi colhida entre as densidades de 8 a 10% de ficoll. Em outras densidades de ficoll havia promastigotas em divisão celular e com morfometria similar à cultura de 2º dia.

Tabela IV – Promastigotas coletadas em gradiente de ficoll entre 8 a 10% mostrou as dimensões celulares mostradas na tabela, quantificadas em microscópio acoplado a computador e analisado com o software Axion Vision 4.0. Os dados são a média de três experimentos independentes.

	Corpo Celular (µm)	Flagelo (µm)	Largura (µm)
Promastigotas 2º dia de cultura	15,21±0,16	9,46±0,58	2,27±0,09
Promastigotas 6º dia de cultura	12,55±1,32	22,63±1,10	1,29±1,10
PLA2	11,23±0,81	26,74±3,45	1,22±0,04
CRP	11,41±1,25	21,28±3,58	1,25±0,01

Após realizar contagens das promastigotas colhidas entre essa faixa de densidade de ficoll (8 a 10%) foi verificado que a concentração dessas promastigotas era relativamente baixa, não sendo possível dar continuidade aos experimentos de infecção *in vivo*. A tabela II sumariza a porcentagem de promastigotas colhidas entre 8 a 10% de ficoll com os diferentes tratamentos.

Tabela V – Porcentagem de promastigotas colhidas após centrifugação em gradiente de ficoll nas densidades entre 8 a 10%.

Grupos	Porcentagem
Promastigotas 6º dia de cultura	31%
PLA2	22%
CRP	17%
Controle	23,5%

É possível verificar que a maior parte de promastigotas foi colhidas na cultura com seis dias. As promastigotas tratadas com a PLA2 não mostraram diferenças significativas na porcentagem de promastigotas colhidas em relação ao controle, entretanto, o grupo tratado com a CRP apresentou uma menor porcentagem de recolhimento, cerca de 17%, apresentando diferenças significativas com o grupo controle e os outros grupos tratados.

3.7 – Infecção *in vivo*

Promastigotas foram tratadas com PLA2 e CRP por 24 horas e então inoculadas na pata traseira de camundongos Balb/c. A intervalos regulares de cinco dias, durante quarenta dias, foram realizadas medições da pata e contrapata com micrômetro.

Nos primeiros 15 dias foi verificado que o tamanho da lesão do grupo controle cresceu mais que os grupos tratados. Posteriormente (após 20 dias), observou-se o acentuado crescimento do grupo tratado com PLA2, superior ao do grupo controle. Nesse mesmo período o tamanho da lesão causado pelo grupo de promastigotas tratadas com a CRP mostrou cerca de metade do crescimento do tamanho da lesão causado pelo grupo de promastigotas tratadas com PLA2 (Figura 17).

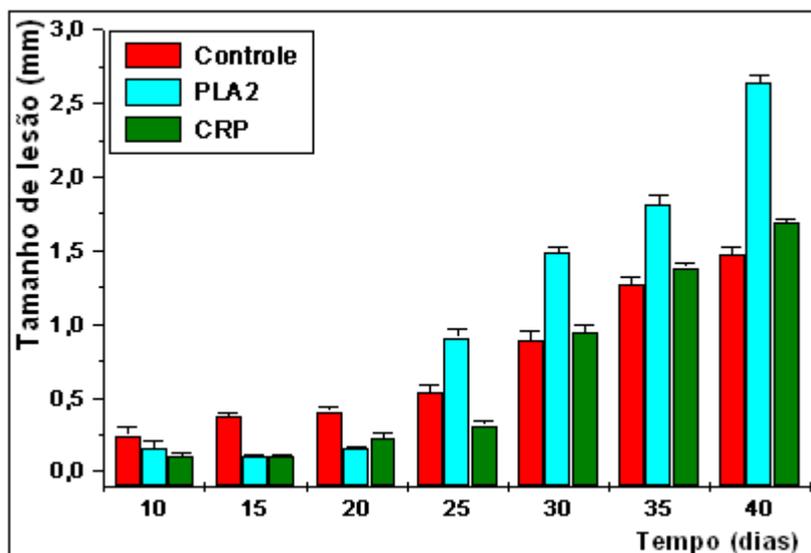


Figura 17 – Perfil da infecção de camundongos Balb/c através de medições de patas e contrapatas. É possível verificar que após 20 dias de infecção houve uma exacerbação do tamanho da lesão do grupo tratado com PLA2 em relação ao grupo controle. A CRP, entretanto, apresentou valores de lesão menores ou similares ao do grupo controle no período analisado. Os resultados estão expressos como a média \pm desvio padrão de 4 animais.

No 40º dia de infecção, o tamanho de lesão dos grupos tratados foi significativamente maior do que o grupo controle.

3.8 – Análises histológicas

3.8.1 – Análise histopatológica através da coloração hematoxilina/eosina

Através da coloração com hematoxilina/eosina foi verificada a característica da lesão de cada grupo, onde foi possível quantificar o número de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares nos cortes histológicos.

Em todos os grupos foi observado que há uma maior quantidade de células mononucleares em relação aos polimorfonucleares.

A) Grupo controle

No grupo controle foi verificado que há um intenso infiltrado inflamatório difuso pela derme com grande quantidade de polimorfonucleares (cerca de 1890 polimorfonucleares/mm²), mononucleares e macrófagos vacuolizados (5165 mononucleares/mm²), com muitas amastigotas em seu interior, há poucos linfócitos e regiões difusas de necrose, nessa análise foi verificada uma grande quantidade de amastigotas fora de células. A figura 18 ilustra as características da lesão do grupo controle.

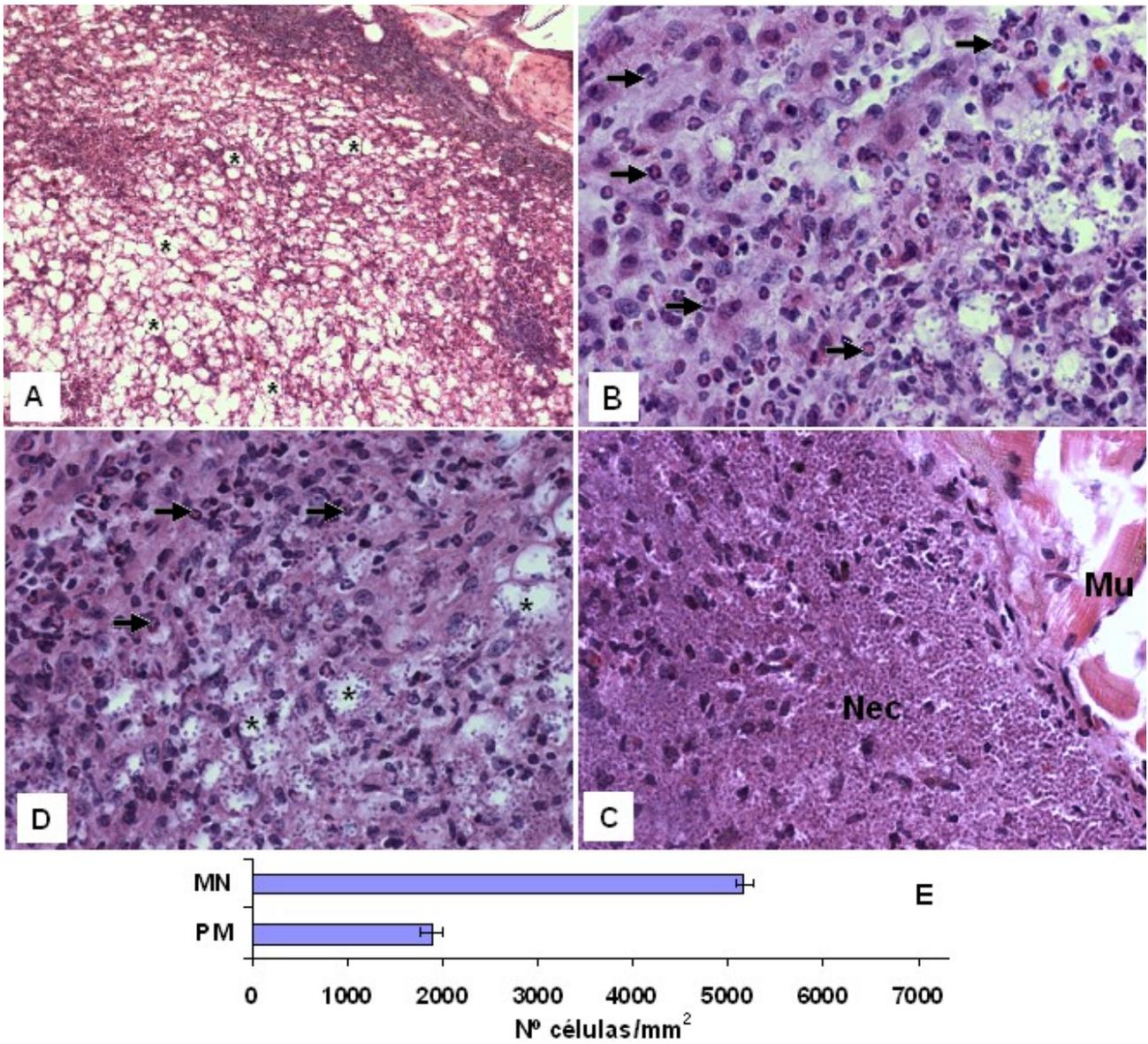


Figura 18 – A imagem A mostra muitos vacúolos (asteriscos) presentes nos macrófagos (100x), as imagens B e c mostram algumas das células polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos – setas pretas) próximos a região onde há vacúolos com amastigotas no interior de células fagocíticas (aumento de 400x). A imagem D mostra uma região de necrose (Nec) próxima à área de fibras musculares (Mu) (aumento de 200x). A imagem E mostra que a densidade de mononucleares (MN) é superior ao de polimorfonucleares (PM).

B) Grupo da PLA2

No grupo em que as promastigotas foram tratadas com PLA2 foi verificado que houve um intenso infiltrado inflamatório difuso pela derme, há grandes quantidades de leucócitos polimorfonucleares (3269 polimorfonucleares/mm²), com grande quantidade de mononucleares e macrófagos vacuolizados (7850 mononucleares/mm²) com muitas amastigotas em seu interior, há uma pequena quantidade de linfócitos e regiões de necrose intensa em faixas. A figura 19 ilustra as características da lesão desse grupo experimental.

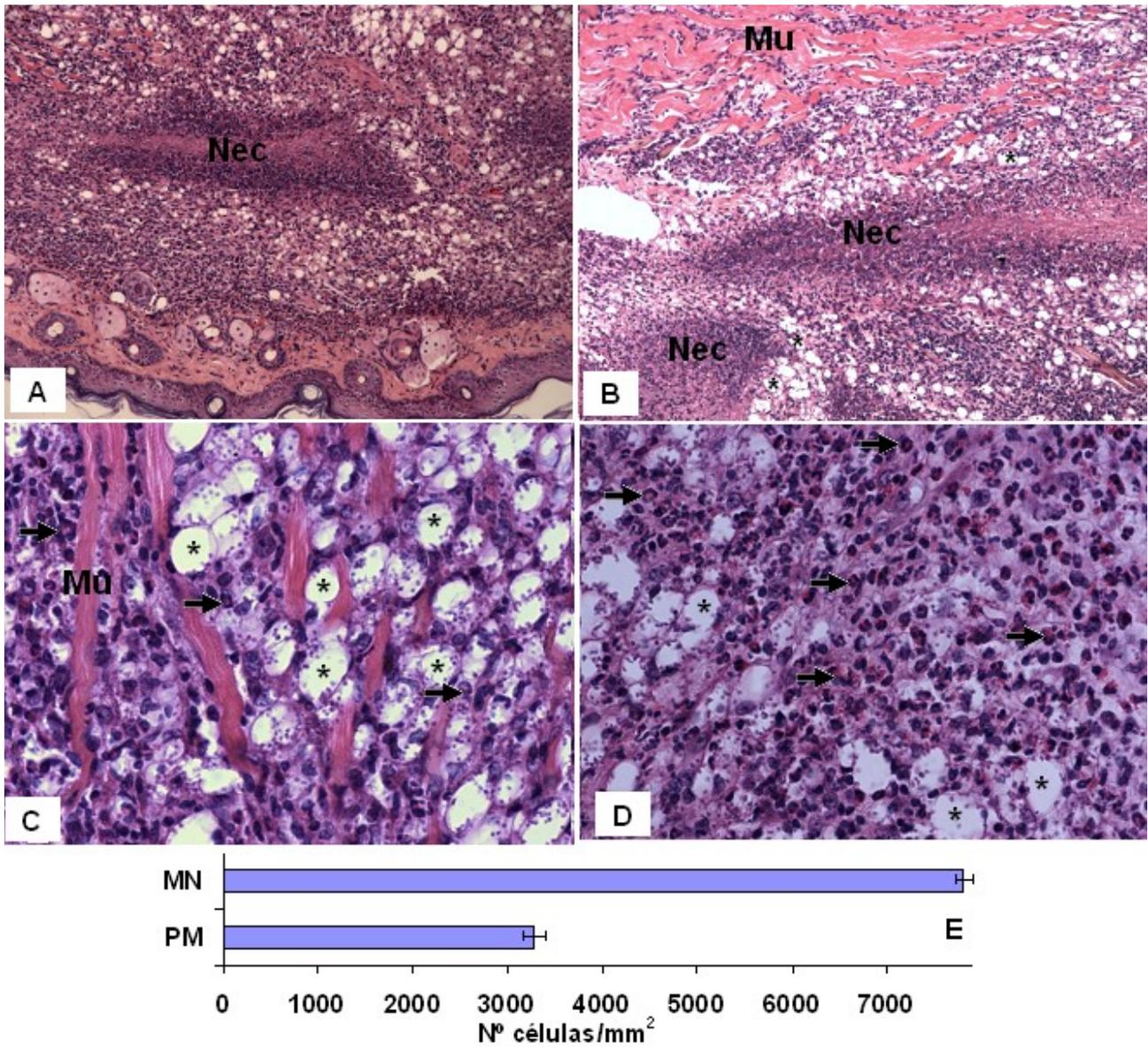


Figura 19 – As imagens A e B (aumento de 100x) mostram regiões de necrose (Nec) em faixa com a presença de muitos vacúolos no tecido (asteriscos). As imagens C e D (aumento de 400x) mostram regiões com grande quantidade de células polimorfonucleares (setas) e a presença de vacúolos (asteriscos), na imagem C é possível verificar a presença de células inflamatórias e amastigotas próximas a regiões de fibras musculares. A imagem E mostra que a densidade de mononucleares (MN) é superior ao de polimorfonucleares (PM).

C – Crotapotina

No grupo em que as promastigotas foram tratadas com CRP, verificou-se que há um infiltrado de polimorfonucleares intenso (2868 polimorfonucleares/mm²). Com uma grande quantidade de mononucleares e macrófagos vacuolizados (5653 mononucleares/mm²), com moderadas quantidades de amastigotas em seu interior, há uma pequena quantidade de linfócitos e moderadas regiões de necrose. A figura 20 ilustra as características da lesão desse grupo experimental.

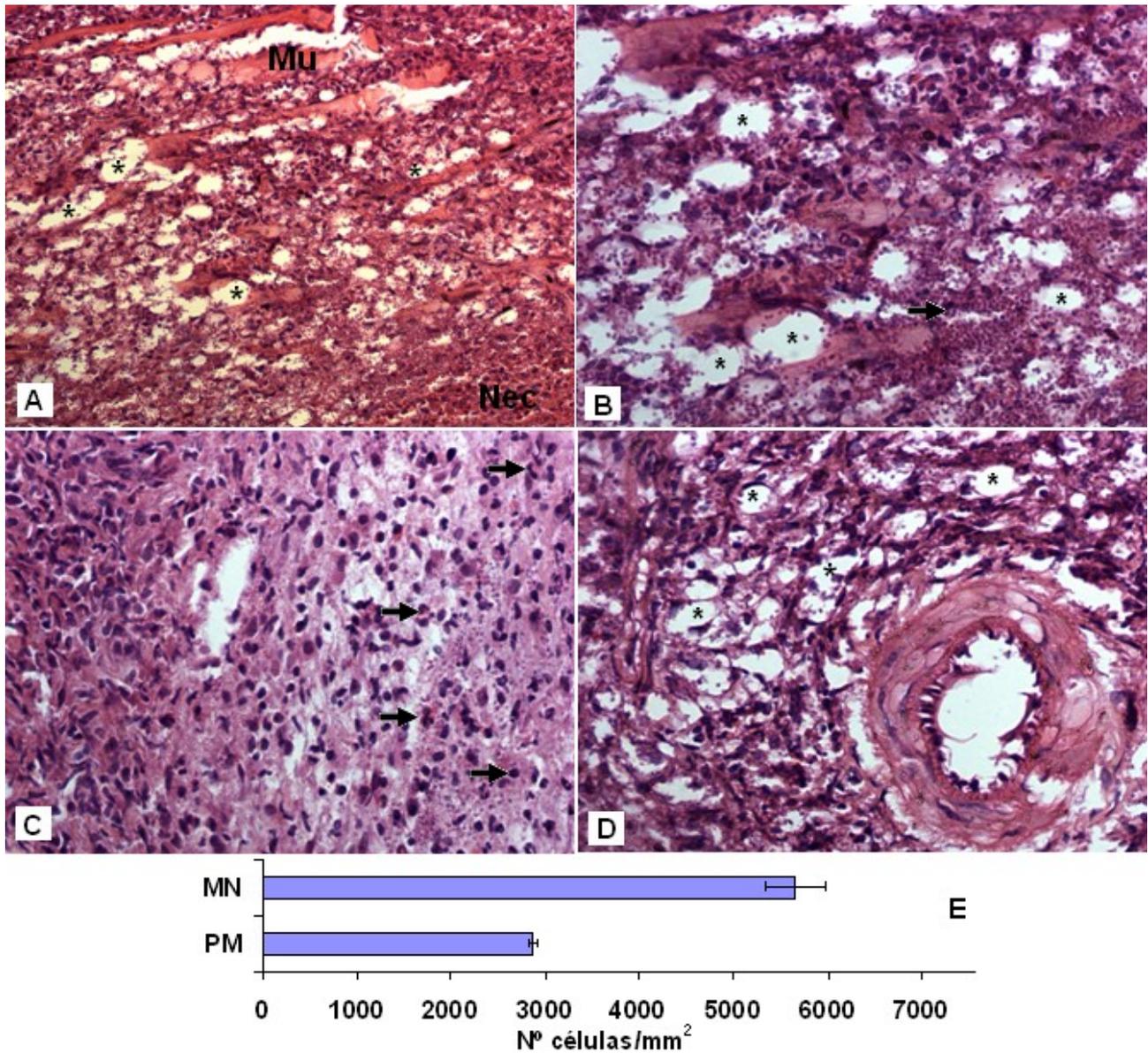


Figura 20 – A imagem A (aumento de 200x) mostra que em áreas de fibras musculares (Mu) há vacúolos (asteriscos) com amastigotas no interior há menores regiões de necrose quando comparado com os outros grupos experimentais. As imagens B, C e D (aumento de 400x) mostram polimorfonucleares. A imagem E mostra que a densidade de mononucleares (MN) é superior ao de polimorfonucleares (PM).

3.8.2 - Quantificação de amastigotas em tecido através de imunohistoquímica

Através da técnica de imunohistoquímica foi verificada a carga parasitária da lesão de cada grupo experimental, onde foi possível quantificar o número de amastigotas/mm². Nas biópsias de animais infectados com promastigotas tratadas com PLA2 foram encontradas maiores densidades de amastigotas em relação ao grupo da CRP ou mesmo no grupo controle.

A) Controle

No grupo controle, foi verificado que a densidade de amastigotas no tecido foi de aproximadamente 30000 amastigotas/mm² (Figura 21 E), com uma grande quantidade de células vacuolizadas (21 A, B, C, D, E).

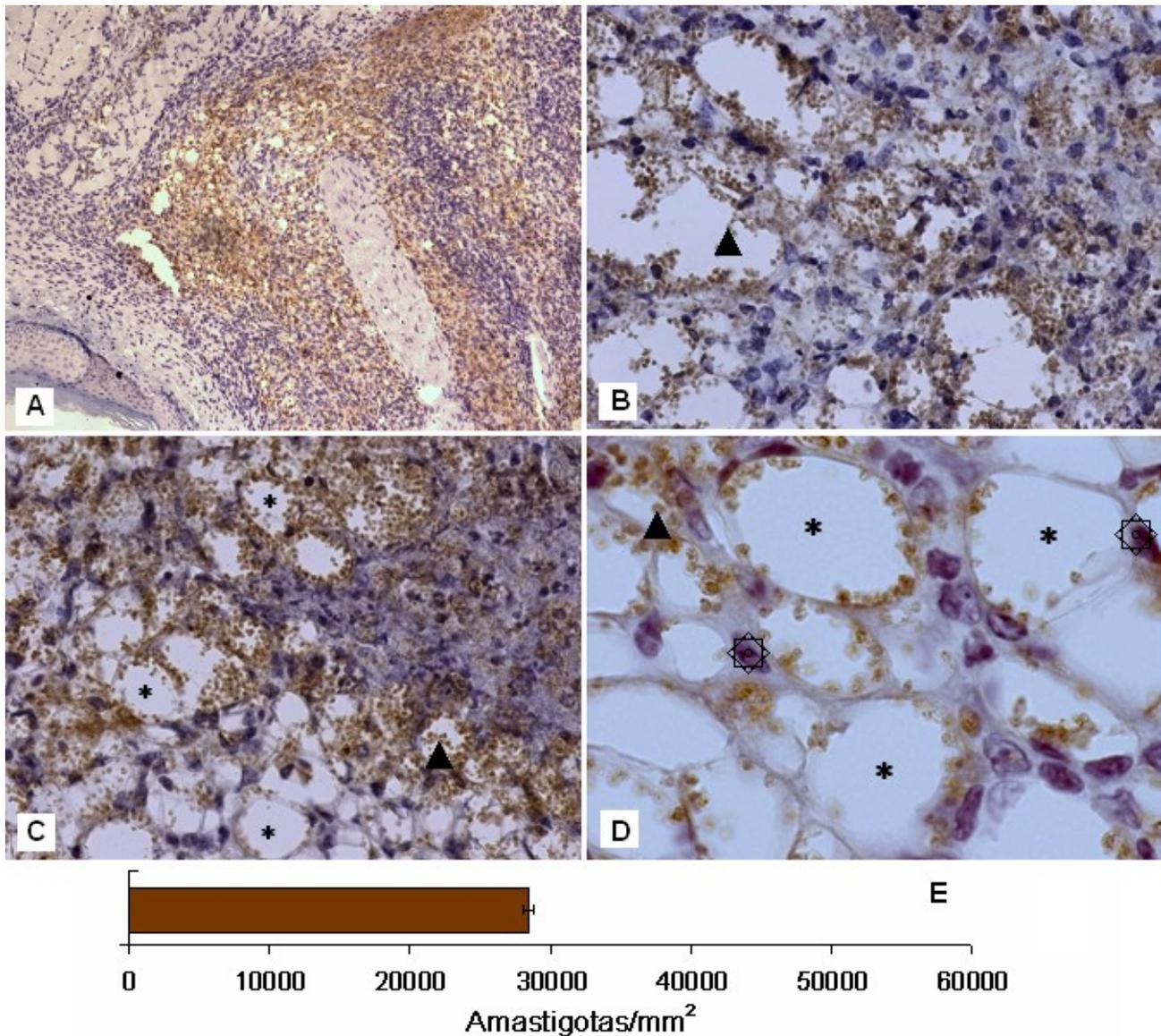


Figura 21 – A imagem A (aumento 100x) mostra uma região que possui grande densidade de amastigotas (tons marrons). As figuras B e C (aumento de 400x) mostram os vacúolos (asteriscos) formados por amastigotas (triângulos), a figura D (aumento de 1000x) mostra em detalhes os grandes vacúolos e a disposição de *L. (L.) amazonensis* em seu interior, as estrelas mostram os núcleos dos macrófagos. A imagem E mostra a densidade de amastigotas quantificadas nos tecidos quantificados, cerca de 30000 amastigotas/mm².

B) PLA2

No grupo em que as promastigotas foram tratadas com a PLA2, foi encontrada uma densidade de amastigotas no tecido de aproximadamente 50000 amastigotas/mm² (Figura 22 E), com uma grande quantidade de células vacuolizadas (Figura 22A, B, C, D, E).

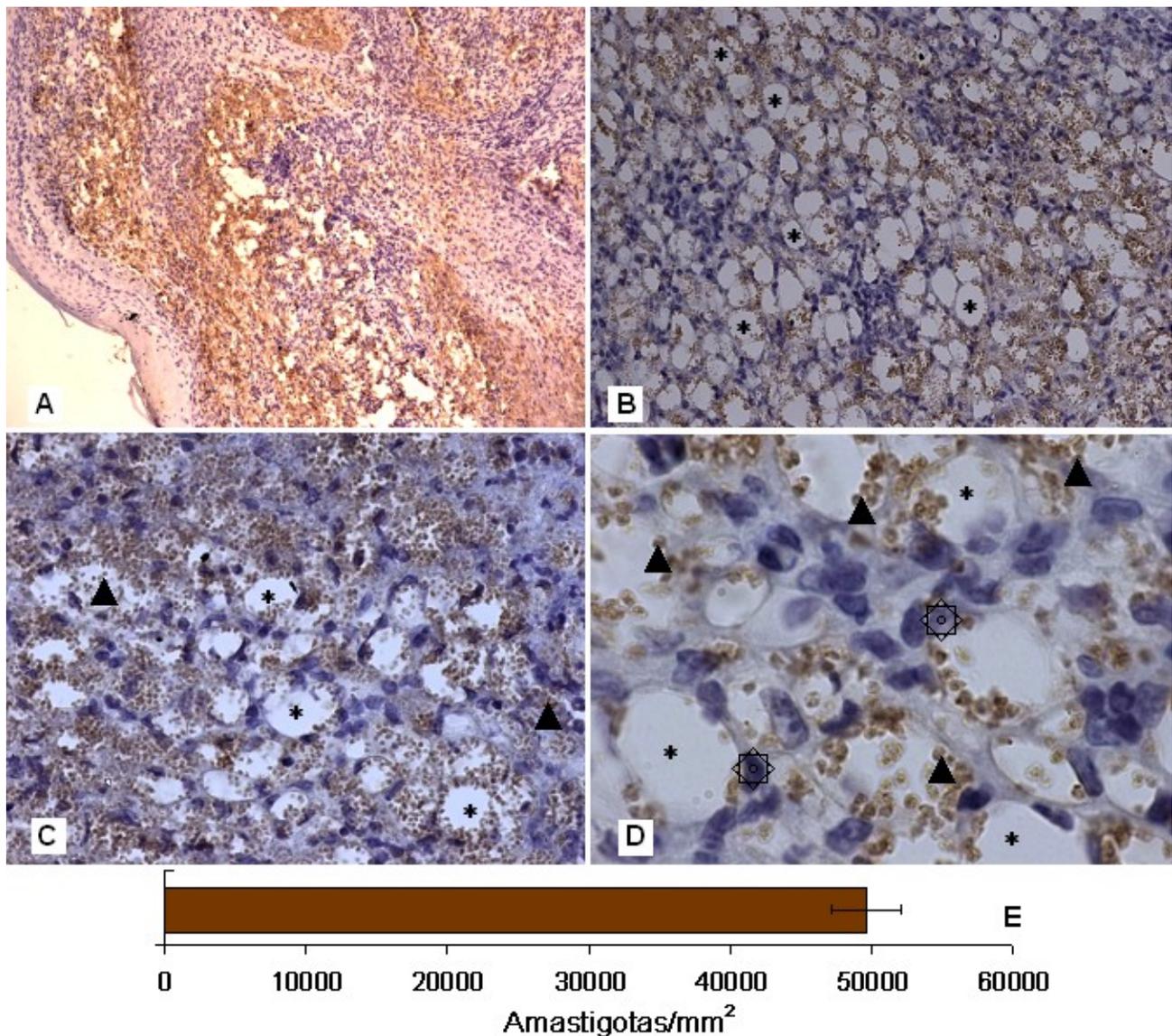


Figura 23 – A imagem A (aumento de 100x) mostra uma grande densidade de amastigotas (em tons marrons) por todo o tecido, podendo inclusive ser verificada próxima a região da epiderme. As imagens B (aumento de 200x) e C (aumento de 400x) mostram muitos vacúolos (asteriscos) repletos de parasitos (triângulos). A imagem D (aumento de 1000x) mostra em detalhes o vacúolo das células fagocíticas com muitas amastigotas em seu interior, as estrelas mostram os núcleos dos macrófagos. A imagem E mostra a densidade de amastigotas quantificadas nos tecidos, cerca de 50000 amastigotas/mm².

C - Crotapotina

No grupo em que as promastigotas foram tratadas com a CRP, foi encontrada uma densidade de amastigotas no tecido de aproximadamente 23000 amastigotas/mm² (Figura 24 E), com menores quantidades de células vacuolizadas comparadas aos grupos anteriores. A figura 24 A mostra focos de marcações positivas para amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. A figura 24 A, B, C, D, E mostra poucas células vacuolizadas, entretanto, há amastigotas no tecido.

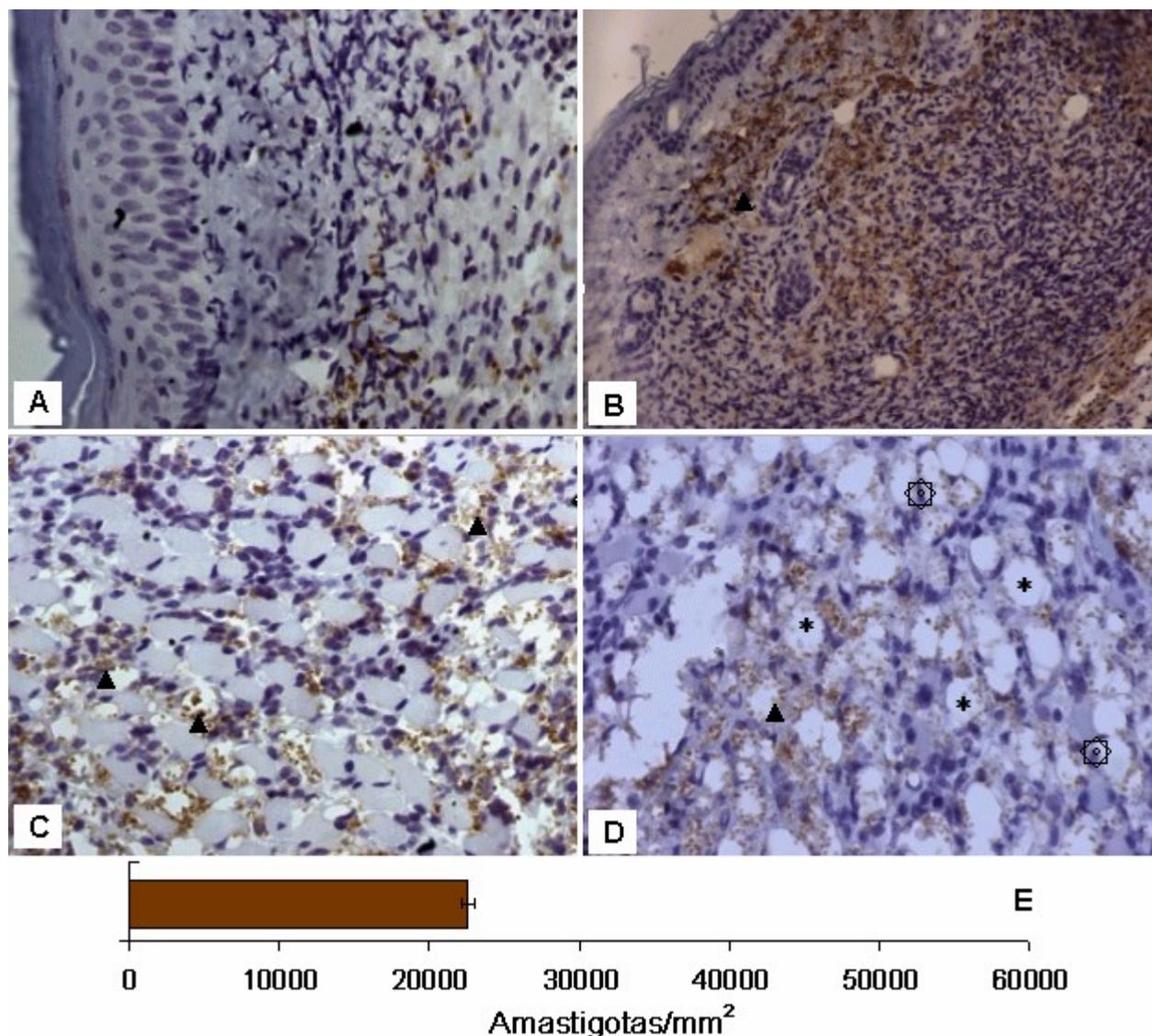


Figura 24 – A imagem A e B (aumento de 100x) mostram que há uma menor marcação positiva (tons marrons) para *L. (L.) amazonensis* quando comparado aos outros grupos experimentais. A imagem C (aumento de 400x) mostra as amastigotas (triângulos) presentes no tecido. A imagem D (aumento de 400x) mostra vacúolos nos tecidos (asteriscos), mas com menores quantidades de parasitos em seu interior. A estrela mostra o núcleo do macrófago. A imagem E mostra densidade de amastigotas.

3.9 – Outro modelo experimental

3.9.1 – *Trypanosoma cruzi*

Epimastigotos foram tratados com PLA2 e após 24 horas foram contados em câmara de Neubauer. Tal análise mostrou que a PLA2 causou significativo aumento de uma forma dose-dependente (Figura 25). Em outros experimentos (dados não mostrados) foi verificado que a PLA2 é capaz de induzir aumento no número de parasitos em concentrações menores.

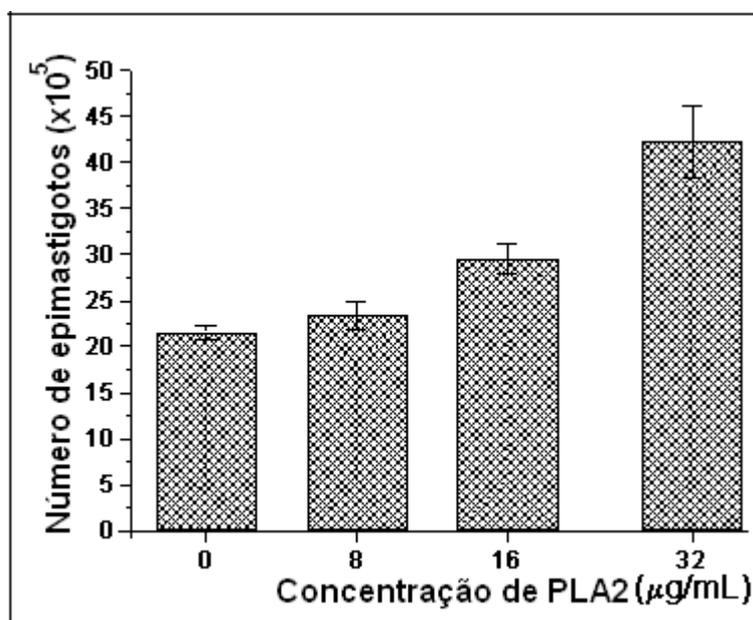


Figura 25 – Crescimento do número de epimastigotos com as menores concentrações de PLA2 testadas, avaliada por contagem em câmara de Neubauer. A análise mostrou que o crescimento ocorreu de uma maneira dose-dependente. Os resultados são expressos como a média±desvio padrão de três experimentos independentes (n=3 p=0,01)

4.0 – Discussão

4.1 - Fracionamento do veneno total de *C. d. collilineatus* e atividade enzimática

Os venenos crotálicos apresentam como principal fração protéica a crotoxina, uma neurotoxina composta por uma subunidade básica com atividade fosfolipásica A2 e uma subunidade ácida denominada crotapotina, desprovida de atividade enzimática. Em uma mesma espécie, esse complexo protéico pode apresentar diferenças quantitativas e qualitativas, como mostra o trabalho desenvolvido por Rangel-Santos et al (2004), que mostrou diferenças enzimáticas e farmacológicas da crotoxina das serpentes *C. d. cascavella*, *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus*. Nessas subespécies a crotoxina perfazia cerca de 60% do veneno e a maior atividade enzimática foi encontrada na crotoxina de *C. d. terrificus*, outros trabalhos também mostram similaridades entre o perfil fosfolipásico A2 para crotoxinas de outras subespécies, como Ponce-Soto et al (2002) e Toyama et al (2003). Outra importante característica sobre as PLA2 secretórias é o requerimento de cálcio para que ocorra a atividade enzimática, devido à presença de uma dupla de aminoácidos adjacentes, Histidina/Aspartato, nas posições 49 e 50, respectivamente (Six & Dennis, 2000).

No presente trabalho, a PLA2 do veneno de *C. d. collilineatus* apresentou similaridades na quantidade de crotoxina, na atividade enzimática e no requerimento de cálcio com os dados da literatura científica. Pequenas diferenças foram encontradas, como temperatura e pH ótimos para atividade enzimática, esse fato pode estar relacionado com a biologia das serpentes, pois os hábitos alimentares, sexo e idade das serpentes são fatores relevantes nas propriedades físico-químicas dos venenos. Generalizando, a PLA2 usada no experimento apresenta características compartilhadas por outras PLA2 crotálicas, mostrando assim que essa proteína foi isolada e identificada com sucesso.

4.2 - Determinação da seqüência de aminoácidos da PLA2

O conhecimento prévio dos resíduos de aminoácidos que compõe uma proteína em determinada espécie é de extrema importância, pois é um pré-requisito para determinação da sua estrutura tridimensional e é necessário para entender seu

mecanismo molecular de ação. A comparação das seqüências entre proteínas análogas de espécies diferentes fornece elementos para entender suas funções e pode inclusive revelar relações evolucionárias entre proteínas e os organismos que as produzem. Portanto, estudos comparativos entre estrutura e a função das PLA2 podem revelar funções fisiológicas similares entre as proteínas.

Como as PLA2 estão distribuídas em diversos grupos animais e celulares, houve uma separação em grupos e subgrupos. O grupo II abrange uma ampla variedade dessas enzimas, que compreendem as do veneno crotálico e botrópico, do líquido sinovial humano, do baço e pâncreas de camundongos e humanos, entre outras.

Dentre as do grupo II, algumas são consideradas proteínas de fase aguda, que são expressas em maiores quantidades quando algum estado patológico é desencadeado (Baumann 1994). Altas quantidades de PLA2 são encontradas no líquido sinovial humano, em pacientes com artrite reumatóide. Outras PLA2 atuam como fator de crescimento, essas quando encontram certos tipos de receptores celulares expõem sítios ativos para outra molécula, o fator de crescimento epidermal (Kadan e Mulherkar 1999). Outras PLA2, associadas à membrana têm funções ainda não totalmente esclarecidas (Ishizaki et al 1989), porém sabe-se que quando há ligações dessas proteínas aos receptores de membrana há uma via de sinalização com conseqüente formação de prostaglandinas. Biologicamente, essas proteínas diferem das PLA2 crotálicas em suas funções, porém alguns sítios que são conservados entre as diferentes espécies podem mostrar certas similaridades funcionais. Como verificado na figura 4, as três PLA2 de mamíferos apresentam certas regiões com seqüências altamente conservadas, quando comparadas às de *C. d. collilineatus*, um exemplo de identidade entre as diferentes proteínas é o encontrado na proteína EF, cujo sítio ativo apresenta cerca de 80% de identidade com a PLA2 de *C. d. collilineatus*. Contudo, há regiões em que a identidade é muito pequena ou ausente, como foi verificado na alfa hélice e folha beta pregueada das PLA2 crotálicas e de mamíferos.

Um estudo mais aprofundado que inter-relacionasse regiões da PLA2 de *C. d. collilineatus* com as atividades encontradas em outros modelos experimentais por outras PLA2 seriam de importância fundamental para entendimento dos variados mecanismos de ação ocasionados pela proteína em questão. Como exemplo, pode-se

citar o trabalho realizado por Prijateli et al (2006) onde mostram que a região C-terminal da PLA2 da serpente *Vipera ammodytes ammodytes* provavelmente é responsável pela neurotoxicidade e que sua depleção e posterior expressão em *Escherichia coli*, a torna menos tóxica. Dessa forma, seqüências similares entre a PLA2 de *V. a. ammodytes* e a de *C. d. collilineatus* poderiam estar associadas aos efeitos neurotóxicos.

Diversos experimentos são realizados com a finalidade de compreender as funções dessas proteínas, tal como experimentos empregando a mutagênese dirigida, onde foi verificado que os resíduos de aminoácidos 6 e 8 da tricrotoxina, uma fosfolipase A2, eram responsáveis pela especificidade neuronal e por determinados substratos. Essas proteínas mutantes apresentavam menor atividade neurotóxica e enzimática (Tsai et al 1998). De forma similar, o emprego da mutagênese dirigida poderia ser utilizada para verificar quais regiões da PLA2 de *C. d. collilineatus* é responsável pelos efeitos biológicos apresentado nesse trabalho.

Alguns estados patológicos induzidos por diferentes grupos dessas proteínas, poderiam ser estudados da mesma forma, um exemplo seria no potencial crescimento de células tumorais e conseqüente angiogênese (Murakami 2005) ou mesmo na artrite reumatóide (Hara 1989). Esse tipo de estudo poderia também elucidar alguns processos fisiopatológicos nas infecções, onde se acredita que as PLA2 estão envolvidas, como no caso das leishmanioses (Dwyer 1983).

4.3 - Ensaio de Citotoxicidade

As PLA2 possuem uma diversidade muito grande, pois estão distribuídas em diversos grupos animais, desde invertebrados até vertebrados. Algumas delas são responsáveis por digestão da presa, como no caso de algumas PLA2 de serpentes (Valentin e Lambeau, 2000). Essas proteínas apresentam diferentes especificidades por receptores na célula alvo. Algumas PLA2 possuem maior especificidade por receptores de células musculares esqueléticas (receptores tipo M), desencadeando efeitos mionecróticos, outras possuem maior especificidade por receptores neuronais (receptores tipo N), presentes em células nervosas e desencadeando, portanto, efeitos neurotóxicos.

Recentes estudos têm demonstrado que a PLA2 de *Bungarus multicinctus*,

presentes no complexo protéico da β -bungarotoxina, apresenta atividade citotóxica contra células neuronais cerebelares, porém esse efeito está ligado à geração de radicais livres e a ativação de caspases, enzimas que desencadeiam processo de morte celular. A β -bungarotoxina foi mais potente que outras toxinas, tais como cardiotoxina, melittina e a PLA2 de *Naja naja*. Outros estudos mostram que a fração sem atividade de PLA2 da β -bungarotoxina não apresentam atividade citotóxica e que a conformação do complexo protéico é essencial para que efeitos como letalidade e morte celular ocorram (Chang e Yang, 1993).

Estudos comparativos de atividade citotóxica têm sido realizados com as diversas PLA2 de serpentes em células endoteliais e mioblásticas, pois tais células são um dos principais alvos das toxinas de serpentes. Nas células endoteliais e mioblásticas, a PLA2 de *C. d. terrificus* apresentou atividade citotóxica comparada com as PLA2 botrópicas, contudo, a CRP não apresentou atividade significativa (Lomonte et al, 1999).

Em trabalhos posteriores, Sampaio et al (2001), havia verificado que o veneno total de *C. d. terrificus* apresentava efeitos distintos em macrófagos, inibindo o espraiamento e fagocitose e estimulando a produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, assim como o metabolismo de glicose e glutamina, onde nenhuma atividade citotóxica foi verificada, entretanto, em células de eritroleucemia murina a crotoxina da mesma espécie mostrou atividade citotóxica e dependente da PLA2 (Corin, et al 1993).

Portanto, a citotoxicidade é um processo em que deve haver interações entre a molécula e a linhagem celular para que seja desencadeada diferente via celular, podendo inclusive levar a morte da célula. Em nossos modelos experimentais (macrófagos peritoneais de camundongos), os resultados obtidos mostraram que essa interação entre proteína e célula não desencadeou efeitos deletérios como a crotoxina de *C. d. terrificus* apresentou em células de eritroleucemia.

4.4 - Tratamento de promastigotas com PLA2 e CRP

Nossos resultados mostraram que as promastigotas tratadas com a PLA2 cresceram significativamente mais do que o grupo controle, esse resultado indica que a

adição de PLA2 exógena em cultura de promastigotas deve funcionar como uma espécie de fator de crescimento. Outras PLA2 também são consideradas fatores de crescimento para alguns tipos celulares. A PLA2 denominada EF (*enhancing factor*), de 14kDa, isolada de intestinos de ratos é um modulador de crescimento específico das células Paneth. Essa proteína é capaz de se ligar a receptores específicos de sua própria célula e oferecer um sítio ligador para EGF (fator de crescimento epidermal). Esse complexo, formado por EF/EGF funciona como fator de crescimento para fibroblastos mantidos em ágar (Mulherkar e Deo 1986). Arita 1991 mostrou que a sPLA2 pancreática também foi capaz de estimular crescimento em fibroblastos murinos.

Outras PLA2 de serpentes também apresentam atividades estimulatórias em diferentes modelos celulares. A PLA2 de *Bothrops asper* mostrou ser um fator de crescimento usando como modelos as células da linhagem CRL-8062, contudo a dose foi um fator limitante (Mora et al 2005). A Ammoditina L, proteína homóloga a PLA2, sem atividade enzimática, de *V. a. ammodytes* apresenta atividade miogênica em fibroblastos de ratos em cultura (Ruffini et al, 1996).

O mecanismo de ação, assim como a região responsável para essas atividades estimulatórias das sPLA2 de venenos de serpentes são, até o momento incertas e verificadas em muitos tipos celulares.

De forma contrária, a CRP não apresentou a atividade estimulatória vista pela PLA2, mas sim atividade anti-leishmania, o que não era esperado, pois alguns trabalhos mostram que a CRP atua como uma proteína chaperone, aumentando as atividades da PLA2 em alguns modelos experimentais (Bon et al, 1979). Entretanto, outros trabalhos mostram que a CRP apresenta atividade anti-inflamatória sendo capaz de se ligar à PLA2 e assim diminuir ou mesmo inibir a atividade da PLA2 (Garcia et al, 2003). Le Pape et al (2000) tentando inibir o crescimento de *L. donovani* com proteína de esponja verificou que houve mudanças no conteúdo lipídico e inclusive na atividade fosfolipásica A2 dos parasitos, mostrando assim que essas enzimas possuem importante papel na fisiologia parasitária, logo a adição de um inibidor de PLA2 (a CRP) ao meio de cultivo certamente influenciaria na viabilidade celular.

O efeito causado pela PLA2 de *C. d. collilineatus* sob amastigotas e promastigotas de *L. (L.) amazonensis* também é verificado em epimastigotos de *T.*

cruzi, um microorganismo pertencente à ordem Kinetoplastida, como *Leishmania*. Alguns estudos mostraram que *T. cruzi* possui PLA2 e PLA1 (Bertelo et al, 2000) e que essas proteínas estão relacionadas com sua capacidade invasiva na célula hospedeira, pois a utilização de inibidores específicos foi capaz de diminuir a invasão de formas tripomastigotas nas células hospedeiras (Connelly e Kierszenbaum).

O crescimento causado pela PLA2 sob *L. (L.) amazonensis* e *T. cruzi* também foi observado em *Saccharomyces cerevisiae* (dados não mostrados). Muitos estudos mostram que o metabolismo lipídico de fungos e *Leishmania* (ergosterol) são similares, pois um dos medicamentos atualmente utilizados contra a leishmaniose (Amphotericina B) é fungicida (Rath, S et al 2003). E como as PLA2 são enzimas que agem em lipídeos há uma forte evidência que o crescimento de *S. cerevisiae* ocorra de uma forma similar. Yost et al (2001) mostrou que as PLA2 e PLA1 também estão fortemente correlacionadas à fisiologia desses microorganismos, pois elas são essenciais na manutenção das membranas mitocondriais nos ambientes ácidos. Em *Escherichia coli*, uma bactéria gram-negativa, a PLA2 não causou efeito algum (dados não mostrados), vale ressaltar que a fisiologia bacteriana não é semelhante a esses protozoários e de forma oposta, as PLA2 têm uma forte atividade bactericida (Buckland e Wilton, 2000).

Portanto, em organismos que apresentam alguma característica evolucionariamente similar, como *Leishmania* e *T. cruzi* (cuja PLA2 já foi isolada) e entre *Leishmania* e *S. cerevisiae* (similares metabolismo lipídico) houve ação similar da PLA2, com aumento no crescimento celular, logo as evidências sugerem que os protozoários do gênero *Leishmania* possuam PLA2.

4.5 – Testes de avaliação de metaciclogênese

O objetivo desses experimentos foi verificar se o tratamento das promastigotas com PLA2 ou CRP seria capaz de induzir maior infectividade aos parasitos, através de experimentos clássicos.

Diversos trabalhos mostraram que promastigotas não infectantes são mais sensíveis à lise por soro do que as infectantes (Franke et al 1985, Câmara et al 1995). Em nosso modelo experimental de lise mediada por soro humano, verificamos que há diferenças significativas entre o grupo de promastigotas no 2º dia de cultivo e o grupo

controle (6º dia de cultivo), pois a cultura de 2º dia apresentou maiores quantidades de formas procíclicas que foram mais sensíveis e à lise por soro. Os grupos que foram tratados com PLA2 ou CRP não apresentaram diferenças significativas com o grupo controle, logo, esse experimento indicou que os tratamentos não induziram maior infectividade aos parasitos. Outro fator que poderia indicar maior infectividade seria a quantidade de proteínas expressas nos grupos tratados e controle, indicando assim uma maior infectividade. Genestra et al (2004), mostraram que em frações de membrana celular de formas procíclicas e metacíclicas há diferenças quanto a quantidade de proteínas, onde as formas metacíclicas expressam maiores quantidades de proteínas, entretanto, em nosso modelo experimental não houve diferenças significativas entre os grupos controle e tratados em relação a quantidade de proteínas. A morfometria dos parasitos, que seria outra característica na decisão de uma maior infectividade entre os grupos tratados, mostrou que os grupos tratados não são diferentes estatisticamente do grupo controle.

Portanto, nossos dados de quantificação de proteínas, resistência à lise por soro e morfometria indicam que o grupo tratado é semelhante ao grupo controle. E como essas características são marcantes de formas metacíclicas, estes dados indicam que a PLA2 não induz uma maior infectividade às promastigotas.

4.6 - Atividade da PLA2 em macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*.

A atividade enzimática indica que uma proteína está presente em uma dada amostra biológica, uma vez que existe especificidade entre substrato e enzima. Em nossos experimentos de atividade enzimática, verificamos que o sobrenadante de *L. (L.) amazonensis* bem como o lisado apresentaram atividade positiva para PLA2. Entretanto, as amostras apresentaram diferentes atividades específicas. Em primeira instância seria coerente dizer que há diferenças quantitativas dessa enzima no sobrenadante em relação ao lisado. Para verificar essa hipótese, foram utilizados inibidores específicos. Tais análises mostraram que a atividade fosfolipásica A2 do sobrenadante foi inibida pelo uso de pBPB e de Indometacina, entretanto, a atividade fosfolipásica A2 do lisado foi inibida apenas com o pBPB e em menores taxas, e o uso de Indometacina bem como de Dexametasona, aumentaram a atividade específica, em

pequenas taxas, mas tais valores são considerados significativos estatisticamente. Tal fato sugere que existem dois tipos de PLA2 em parasitos do gênero *Leishmania*. *T. cruzi* (um organismo relacionado evolucionariamente com *Leishmania* sp) possui diferentes tipos de fosfolipases que estão relacionadas a remodelação de suas membranas celulares e ao processo de invasão celular (Bertelo et al, 2000).

Outros patógenos eucarióticos também utilizam fosfolipases como fatores de virulência, é o caso *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii* e *Cryptosporidium parvum*. Diversos experimentos são realizados com a finalidade de se entender a função das PLA2 em infecções experimentais. Por exemplo, quando se administrou PLA2 exógena à cultura de fibroblastos foi aumentada a invasão de *T. gondii* nessas células, já a inibição dessas PLA2 diminuiu drasticamente a invasão (Saffer, et al 1989). Além disso, foi verificado que o lisado desses microorganismos foi capaz de iniciar liberação de ácido araquidônico e subsequente liberação de metabólitos inflamatórios via ciclooxigenase e lipooxigenase (Thardin et al, 1993).

Em *C. parvum* um perfil similar foi verificado, onde o lisado desses parasitos apresentou atividade específica para PLA2 e o uso de inibidor específico foi capaz de diminuir a infecção nas linhagens celulares em uma maneira dose-dependente. Os autores também discutem sua função na lise das células hospedeiras e na indução de uma resposta inflamatória. Outros trabalhos ainda mostram que De forma similar a esses estudos que utilizam PLA2 na interação parasito/hospedeiro, esse estudo também mostrou que essa enzima pode ser considerada um fator de virulência para *L. (L.) amazonensis*, pois houve um aumento exacerbado de formas amastigotas no interior de macrófagos tratados com a PLA2 de *C. d. collilineatus*. Portanto, esse dado indica que provavelmente essa enzima pode participar do processo infeccioso no sentido de promover a infecção.

A implicação prática da presença dessas enzimas em *Leishmania* provavelmente está relegada à inativação do sistema imune, pois há grandes evidências que esses parasitos são capazes de ativar a cascata do ácido araquidônico com consequente produção de prostaglandinas, principalmente prostaglandina E2 (PGE2) ou mesmo pela formação de leucotrienos, similarmente a *T. gondii*.

Alguns estudos têm demonstrado que as PLA2 pertencentes ao grupo II formam

PGE2 (Murakami et al 1999). Essas moléculas são reconhecidas por suas atividades antiinflamatórias (Herschman et al 1996), como foi mostrado por Davidson et al 1998, ao verificar que a fagocitose de *E. coli* foi diminuída em monócitos humanos quando os pré-tratou com PGE2. Esse fenômeno foi corroborado em estudos *in vivo* que mostraram que injeções de PGE2 em camundongos também diminuiu índice de fagocitose de macrófagos com uma concomitante atividade aumentada de linfócitos T supressores (Kozlov et al 1989). Sampaio et al (2006) também verifica atividade supressora de macrófagos quando os trata com PLA2 de *C. d. terrificus*, pois essas células diminuíram sua atividade fagocítica sobre *Candida albicans*, com conseqüente aumento de PGE2 e 5-lipooxigenase, porém quando os trata com zileuton, um inibidor de 5-lipooxigenase ou com indometacina, um inibidor de COX, a atividade fagocítica se restabelece e tais moléculas antiinflamatórias voltam aos padrões normais.

Outros estudos sugerem indiretamente a presença de PLA2 do parasita, como o estudo desenvolvido por Catisti et al (2000) que verifica o requerimento de Ca^{++} para produção de ácido araquidônico (AA) – cuja enzima inicial para produção de AA é a PLA2. Kabututu et al (2000) verifica perfil similar, pois encontra PGE2 nos parasitas.

Um outro estudo que altamente sugere a presença de PLA2 com origem parasitária é o desenvolvido por Matte et al (2001), onde verificaram que monócitos humanos infectados com *L. donovani* não expressavam RNA mensageiro para PLA2 citosólica e mesmo assim houve grande produção de PGE2 associado com expressão de RNA mensageiro para ciclooxigenase 2. Um padrão semelhante foi encontrado em células de baço de camundongos BALB/c infectados com *L. mexicana*, porém quando essas células foram tratadas com indometacina houve uma diminuição da produção de PGE2 e além disso houve uma polarização da infecção para a resposta imune tipo 1, com produção de interleucina 12 e interferon- γ , assim como a destruição das amastigotas pela produção de óxido nítrico (Perez-Santos e Talamás -Rohana, 2001), sugerindo assim que uma das vias responsáveis pela resposta T-helper 2, bem como pela sobrevivência intracelular da formas amastigotas é desencadeada pela PLA2. Em infecções experimentais *in vivo* por *Leishmania*, também foram encontradas grandes quantidades de fatores depressores de macrófagos, como PGE2 (Bogdan e Röllinghoff, 1998). Dessa forma, a possível presença da PLA2 em protozoários do gênero *Leishmania* deve estar associada ao início da biossíntese dos eucosanóides, e seu

papel infectivo não está associado à ação da enzima, mas sim ao papel imunossupressor sobre macrófagos.

Na tentativa de inibir a PLA2 dos parasitos com Indometacina ou mesmo com Dexametasona, tais parasitos foram tratados com tais inibidores por 24 horas, posteriormente foram utilizados para infectar macrófagos. Nessa análise, verificamos que de forma inesperada, houve um aumento exacerbado da infecção, mostrando assim que a Indometacina e a Dexametasona não foram capazes de inibir a PLA2 dos parasitos, mas sim os macrófagos, uma vez que tais inibidores são conhecidos por suas atividades anti-inflamatórias. Diferentemente desse estudo, dois estudos mostram que o uso de Indometacina nas infecções causadas por *Leishmania* é benéfico, entretanto o modelo experimental difere do modelo usado aqui. O primeiro modelo, desenvolvido por Perez-Santos e Talamás-Rohana (2001), mostra que células de baço infectadas com *Leishmania* pode ser polarizado para um perfil de citocina T helper 1 após tratamento com Indometacina. O segundo modelo, desenvolvido por Jancar, et al (2000) mostrou que macrófagos pré-tratados com Indometacina foram capazes inibir o crescimento de *L. (L.) amazonensis* por um perfil de citocinas similar ao primeiro modelo. Nosso experimento difere dos outros provavelmente ao modelo estudado, pois nosso objetivo foi verificar se a PLA2 parasitária poderia ser inibida com esses inibidores, vale ainda ressaltar que a Indometacina e a Dexametasona são inibidores específicos da ciclooxigenase, mas muitos pesquisadores a utilizam com sucesso na inibição da PLA2. Outros estudos ainda mostram que a Dexametasona não é um bom medicamento para cães com leishmaniose, pois tal tratamento auxilia na progressão da doença através da inativação do sistema imune (Poot et al, 2005). Logo, mais estudos são necessários para verificar a real função dessas enzimas em infecções experimentais.

7.4 – Infecção *in vivo*

A medida da lesão de pata é um indicador de inflamação em modelos experimentais. Os dados apresentados em relação à medida do tamanho de pata mostram que as promastigotas tratadas com a PLA2 mostraram um maior perfil de inflamação. Entretanto, os parasitos incubados com a CRP mostraram valores similares ao grupo controle a partir do 25º dia. Esse efeito da CRP pode estar relacionado com a

viabilidade das promastigotas, pois no modelo em que foram tratadas com essa proteína houve 50% de morte, dessa forma, o tamanho da lesão medido foi menor em relação aos grupos tratados. Tal fato é corroborado através do baixo número de parasitos encontrados nos cortes histológicos.

A PLA2 foi a proteína que elicitou uma maior resposta de células polimorfonucleares, seguida pela CRP. Há duas linhas contrárias sobre a real função das células polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) nas leishmanioses. A primeira delas afirma que os polimorfonucleares possuem papel na progressão da doença, pois quando ocorre a infecção, tais células são as primeiras a migrar para o sítio da picada, e após fagocitar *Leishmania* essas células secretam IL-8 que recruta mais neutrófilos. Nessa fagocitose, os protozoários inibem a função microbicida dos polimorfonucleares, e outras proteínas como a caspase-3, uma das enzimas responsáveis pela apoptose (Squier, 1995), aumentando o período de sobrevivência dessas células para 2 ou 3 dias, enquanto que em condições fisiológicas o período de meia vida seria de 6 a 10 horas. Após dois a três dias, macrófagos e monócitos entram no sítio da infecção, recrutados pelas quimiocinas liberadas pelos polimorfonucleares. Esses macrófagos fagocitarão as células apoptóticas (polimorfonucleares) por identificar em sua superfície fosfatidil serina. Esse tipo de fagocitose não ativa a função microbicida dos macrófagos e assim, é uma via ideal de entrada silenciosa dos parasitos em suas principais células hospedeiras (Laskay et al 2003). A outra linha de pesquisa em relação aos polimorfonucleares nas leishmanioses sugerem que os neutrófilos possuem importância na atividade contra esses parasitos, pois em sangue periférico humano, foi observado que cerca de 47% dos neutrófilos expressavam CD28, e que sua interação com CD80/86 de macrófagos induz a produção de IFN- γ que aumenta a expressão de MHC-II das células apresentadoras de antígeno para iniciar a resposta das células T contra os parasitos (Venuprasad et al 2002). Lima et al (1998) mostrou que leucócitos polimorfonucleares são importantes na contenção da infecção causada por *L. major* em modelos animais (susceptíveis e resistentes) através da depleção desses tipos celulares com anti-polimorfonucleares, pois através de microscopia eletrônica de transmissão verificaram que os parasitos fagocitados por polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, apresentavam graus de degeneração.

Nos modelos experimentais estudados nesse trabalho, verificamos um acentuado

número de células inflamatórias nas biópsias cujas promastigotas foram tratadas com CRP e PLA2. Entretanto, a carga parasitária encontrada nessas biópsias são totalmente distintas. No grupo da PLA2 verificamos uma alta densidade de amastigotas, enquanto no grupo da CRP verificamos baixas densidades de amastigotas. Esses dados podem estar relacionados aos tipos de receptores expressos nos polimorfonucleares, pois como verificado na literatura, os neutrófilos podem ser divididos entre aqueles que expressam CD28 e os que não expressam CD28. Os neutrófilos CD28⁺ tem a capacidade de interagir com certos receptores macrofágicos, induzindo IFN- γ . Em contrapartida, os neutrófilos CD28⁻ não possuem essa capacidade e então a produção de IFN- γ não ocorre, portanto a resposta Th1 não ocorrerá, nem a ativação de macrófagos para destruir as amastigotas (Bogdan e Rölinghoff 1998).

Outro fator que pode dirigir a resposta imune é o antígeno apresentado às células imunes por parte dos parasitos. O grupo de promastigotas que foram tratadas com CRP, possivelmente pode elicitar uma resposta imune mais efetiva contra os parasitos, uma vez que essa proteína isolada do veneno de *C. d. collilineatus* apresentou uma marcada atividade anti-leishmania. De forma oposta, a PLA2 induz crescimento de promastigotas e, portanto, deve apresentar uma função na infecção de hospedeiros mamíferos. Beyrodt et al (1997) caracterizou e identificou um antígeno de amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, com atividade de cisteíno-proteinase que elícita uma resposta imune protetiva do tipo 1 em modelos animais. Portanto, o antígeno liberado pelo parasita e o seu conseqüente trabalho pelo sistema imune do hospedeiro poderão dirigir a resposta do indivíduo.

Nos sítios onde há inflamação uma quantidade muito grande de PLA2 são expressas, somado a esse evento, as células inflamatórias, tais como neutrófilos, eosinófilos e monócitos expressam diferentes tipos de PLA2, o que em conjunto pode gerar grandes quantidades de eucosanóides (Triggiani et al 2005). Nas leishmanioses são encontradas grandes quantidades de células inflamatórias no sítio de infecção, portanto, essas PLA2 pertencentes aos diferentes grupos celulares, presentes no sítio da infecção, podem agravar o estado dos hospedeiros, visto que alguns tipos de PLA2 (como o grupo V e XII) podem ser importantes componentes na diferenciação, recrutamento e ativação de células T helper 2, grupo de células associadas a patogênese da leishmaniose (Triggiani et al 2005).

Com essas multivalentes atividades das PLA2 muitos pesquisadores têm desenvolvido inibidores seletivos para testar em modelos de inflamação, como no caso da molécula nomeada S-5920/LY315920Na com potente atividade inibitória contra PLA2 humana pertencente ao grupo II (Snyder et al 1999) e o Indoxam, cujo uso diminuiu a produção de citocinas induzidas por essa proteína (Granata et al 2005). Singh et al (2005) verificaram que a aspirina, um anti-inflamatório não esteroide induz sua atividade inibitória através de uma ligação específica a PLA2, podendo impedir a liberação de ácido araquidônico. Outro possível inibidor de PLA2 é a 4,5-dihidro-3-(4-tetradeciloxibenil)-1,2,4-*H*-oxadiazol-5-1 que exibiu uma baixa concentração inibitória contra PLA2 e não apresentou qualquer atividade citotóxica contra linhagens celulares. Essa molécula foi capaz de bloquear a atividade da PLA2 induzida por lipopolisacarídeo bacteriano. Estudos desenvolvidos por Woodruff et al (2005) mostrou que a PLA2 está associada com a patogênese da colite e o mesmo grupo demonstrou que o uso de 5-(4-benziloxifenil)-4S-(7-phenilheptanoilamino) ácido pentanóico foi capaz de diminuir o grau de infecção e diminuir o índice de morte dos animais.

A literatura científica mostra que existem inibidores seletivos de PLA2 e que esses atuam em diversos estados patológicos. Logo, seria relevante estudar a ação desses inibidores em infecções, tais como a Leishmaniose e mesmo na Doença de Chagas, uma vez que foi verificada a atividade fosfolipásica A2 em sobrenadante e em lisado de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, além disso, a literatura científica mostrou que *T. cruzi* (um parasito que relacionado a *Leishmania* sp) possui uma PLA2 fortemente associada com a patogênese da doença de Chagas. Logo, uma forma de melhor entender a imunobiologia da PLA2 nas leishmanioses seria utilizar certos inibidores como o Indoxam, ou mesmo o pBPB que em nossos modelos experimentais foi capaz de inibir a atividade fosfolipásica A2 do sobrenadante e lisado, assim, poderíamos inferir sobre a verdadeira função dessas enzimas na progressão da doença bem como o real papel das células inflamatórias nessa doença infecciosa.

5 – Conclusão

A PLA2 é a principal proteína presente no veneno total de *C. d. collilineatus*, onde sua estrutura primária é similar com a estrutura primária de outras PLA2 de mamíferos, sugerindo funções similares.

A PLA2 foi capaz de aumentar o número de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em cerca de 50%, contudo a CRP foi capaz de diminuir em cerca de 50% o número de promastigotas na mesma concentração. Tal aumento no número de promastigotas não foi relatado ao aumento de infectividade, verificado por dois experimentos clássicos para confirmar metaciclogênese (resistência à lise por soro e quantificação de proteínas).

Com substrato específico para PLA2 verificamos atividade fosfolipásica em sobrenadante de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. O pBPB foi capaz de inibir a atividade fosfolipásica A2 do sobrenadante e do lisado, a Indometacina foi capaz de inibir apenas a atividade fosfolipásica do sobrenadante. Tal fato sugere que esses parasitos possuem dois tipos de PLA2, pois apresentam diferentes sensibilidades aos mesmos inibidores. Tal enzima pode estar associada à patogênese da doença.

O tratamento de macrófagos infectados com PLA2 aumentou a carga parasitária nessas células, contudo o tratamento com CRP não causou efeito algum, sugerindo mais uma vez o papel supressor dessa molécula. Corroborando com esses dados, a infecção de camundongos com promastigotas previamente tratadas com PLA2 aumentou a carga parasitária, com um grande influxo de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares. Entretanto, o tratamento com CRP induziu uma menor carga parasitária com densidades de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares superior ao do grupo controle.

Finalizando, os dados apresentados aqui sugerem que a PLA2 é um fator de virulência para *L. (L.) amazonensis*, mas a proteína não está envolvida no processo de metaciclogênese. Tal molécula ainda pode ser o alvo de inibidores específicos para o tratamento da leishmaniose, representando assim uma alternativa para substituir as drogas atualmente disponíveis que apresentam sérios efeitos colaterais aos usuários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arita, H., Hanasaki, K., Nakano, T., Oka, S., Teraoka, H., Matsumoto, K., 1991. Novel proliferative effect of phospholipase A2 in Swiss 3T3 cells via specific binding site. *Journal of Biological Chemical*. 266,19139–19141.
- Ávila-Pires, 2005. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. *Ecologia das zoonoses*, cap 5, pág 53. Vol 1, Ed Guanabara Koogan.
- Awasthi, A. Mathur, R.K., Saha, B., 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian Journal of Medical Research*. 119, 238-58.
- Balsinde, J., Winstead, M.V., Dennis, E.A., 2002. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS letters*. 531, 2-6.
- Barreto, A.C.; Cuba, C.C., 1984. Características epidemiológicas da LTA em região endêmica do estado da Bahia, Brasil. 11 *Leishmaniose canina*. *Rev. Soc. Méd. Trop*, 17-59-69.
- Baumann, H., Gauldie, J., 1994. The acute phase response. *Immunology today*. 15,74-80.
- Bertello, L.E., Alves, M.J., Colli, W., de Lederkremer, R.M., 2000. Evidence for phospholipases from *Trypanosoma cruzi* active on phosphatidylinositol and inositolphosphoceramide. *Biochemical Journal*. 345, 77-84.
- Beyrodt, C.G., Pinto, A.R., Freymuller, E., Barbieri, C.L., 1997. Characterization of an antigen from *Leishmania amazonensis* amastigotes able to elicit protective responses in a murine model. *Infection and immunity*. 65, 2052-2059.
- Bogdan, C.; Röllinghoff, M. 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanism of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology*. 28, 121-134.
- Bon, J., Changeux, T. J., Fraenkel-Conrat, H. 1979. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. *European Journal Of Biochemistry / FEBS*. 99, 471–481.
- Brodin, T.N., Heath, S.; Sacks, D.L., 1992. Genes selectively expressed in the infectious (metacyclic) stage of *Leishmania major* promastigotes encode a potential

basic-zipper structural motif. *Molecular Biochemistry Parasitology*, 52: 211-250.

Buckland, A.G., Wilton, D.C., 2000. The antibacterial properties of secreted phospholipases A(2). *Biochimica et Biophysica Acta*. 31;71-82.

Câmara, M., Ortiz, G., Valero, P.L., Molina, R., Navarro I., Chance, M.L., Segovia, M., 1995. Complement-mediated lysis and infectivity for mouse macrophages and sandflies of virulent and attenuated *Leishmania major* promastigotes varying in expression of the major surface protease and lipophosphoglycan. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 89, 243-51.

Catisti, R., Uyemura, S.A., Docampo, R., Vercesi, A.E., 2000. Calcium mobilization by arachidonic acid in trypanosomatids. *Molecular Biochemistry Parasitology*. 105, 261-271.

Chang, L.S, Yang, C.C., 1993. Separation and characterization of the A chain and B chain in beta 1-bungarotoxin from *Bungarus multicinctus* (Taiwan banded krait)venom. *Bungarus multicinctus* (Taiwan banded krait)venom. *Journal of Protein Chemical*.12, 469 –475.

Connelly, M.C., Kierszenbaum, F., 1984. Modulation of macrophage interaction with *Trypanosoma cruzi* by phospholipase A2-sensitive components of the parasite membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communication*.121, 931-939.

Corin, R.E., Viskatis, L.J., Vidal, J.C., Etcheverry, M.A., 1993. Cytotoxicity of crotoxin on murine erythroleukemia cells in vitro. *Investigational new drugs*. 11(1):11-15.

Davidson, J., Kerr, A., Guy, K., Rotondo, D., 1998. Prostaglandin and fatty acid modulation of *Escherichia coli* O157 phagocytosis by human monocytic cells. *Immunology*. 94, 228-34.

Domingos, M.F., Carreri-Bruno, G.C., Ciaravolo, R.M., Galati, E.A., Wanderley, D.M., Correa, F.M., 1998. American tegumentary leishmaniasis: Phlebotominae in an area of disease transmission, the city of Pedro de Toledo, southern region of the state of Sao Paulo, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 31, 425-431.

Dwyer, D.M., Gottlieb, M. 1983. The surface membrane chemistry of *Leishmania*: its possible role in parasite sequestration and survival. *Journal of cellular biochemistry*. 23, 35-45.

Erman, A., Amiram, R., 1979. Effects of Bivalent Cations on Prostaglandin Biosynthesis and Phospholipase A2 Activation in Rabbit Kidney Medulla Slices. *Biochemical journal*. 182, 821-825.

Flinn, H.M.; DF, R.D.S., 1994. Expression of a hydrophilic surface protein in infective stages of *Leishmania major*. *Molecular Biochemistry Parasitology*, 65:259-270.

Foratini, O.P.; Oliveira, O. 1957. Um foco de leishmaniose tegumentar na zona sul do Estado de São Paulo, Brasil. *Arquivos de Higiene e Saúde Pública*, 11:23-34.

Franke, E.D., McGreevy, P.B., Katz, S.P., Sacks, D.L., 1985. Growth cycle-dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes. *Journal of Immunology*. 134, 2713-2718.

Genestra, M. Cysne-Finkelstein, L., Leon, L., 2004. Protein kinase A activity is associated with metacyclogenesis in *Leishmania amazonensis*. *Cell Biochemistry and Function*. 22: 315–320.

Granata, F., Petraroli, A., Boilard, E., Bezzine, S., Bollinger, J., Del Vecchio, L., Gelb, M.H. Lambeau, G., Marone, G., Triggiani, M., 2005. Activation of cytokine production by secreted phospholipase A2 in human lung macrophages expressing the M-type receptor. *Journal of immunology*. 174,464-474.

Hara, S., Kudo, I., Chang, H.W.; Matsuta, K., Miyamoto, T., Inoue, K., 1989. Purification and characterization of extracellular phospholipase A2 from human synovial fluid in rheumatoid arthritis. *Journal of biochemistry*. 105, 395-409.

Herschanan, H.R. Prostaglandin synthase 2. *Biochimica et Biophysica Acta* 1299, 125–140.

Holzer, M., Mackessy, S.P., 1996. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. *Toxicon*. 1996. 34, 1149-1155.

Ishizaki, J., Ohara, O., Nakamura, E., Tamaki, M., Ono, T., Kanda, A., Yoshida, N., Teraoka, H., Tojo, H., Okamoto, M., 1989. cDNA cloning and sequence determination of rat membrane-associated phospholipase A2. *Biochemical and biophysical research communications*. 162,1030-1036.

Kabututu, Z., Martin, S.K., Nozaki, T., Kawazu, S., Okada, T., Munday, C.J.,

Duszenko, M., Lazarus, M., Thuita, L.W., Urade, Y. Kubata, B.K., 2002. Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9,11-endoperoxide prostaglandin H2 reductase in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*. 32, 1693-1700.

Kadam, S., Mulherkar, R., 1999. Enhancing activity and phospholipase A2 activity: two independent activities present in the enhancing factor molecule. *The Biochemical journal*. 15, 237-243.

Kozlov, V., Poveschenko, A., Gromykhina, N., 1990. Some mechanisms involved in the prostaglandin E2 immunosuppressive effect in (CBA X C57BL)F₁ mice *in vivo*. *Cellular Immunology*. 128, 242-249.

Knuepfer, E., Stierhof, Y.D., MsKean, P.G., Smith, D., 2001. Characterization of a differentially expressed protein that shows an unusual localization to intracellular membranes in *Leishmania major*. *Biochemistry journal*, 356: 335-344.

Laemmli, U.K., Beguin, F., Gujer, Kellenberger, G., 1970. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *Journal of Biological Molecular*. 14:69-85.

Laskay, T., van Zandbergen, G., Solbach, W., 2003. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiology*. 11, 210-214.

Lerner, E.A., Ribeiro, J.M., Nelson, R.J., Lerner, M.R. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *The Journal of biological chemistry*. 1991 Jun 15;266(17):11234-11246.

Lima, G.M., Vallochi, A.L., Silva, U.R., Bevilacqua, E.M., Kiffer, M.M., Abrahamsohn, I.A., 1998. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous leishmaniasis. *Immunology Letters*. 64,145-151.

Lodge, R.; Descoteaux, A., 2005. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clinical Immunology* 114 (2005) 256– 265.

Lomonte, B., Angulo, Y., Rufini, S., Cho, W., Giglio, J.R., Ohno, M., Daniele, J.J., Geoghegan, P., Gutierrez, J.M., 1999. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells *in vitro*. *Toxicon*. 37, 145-158.

Lomonte, B., Angulo, Y., Santamaría, C., 2003. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115–129 in Lys49 myotoxic phospholipases A2 from snake venoms. *Toxicon*. 42, 307-312.

Lonardoní, M.V., Russo, M., Jancar, S., 2000. Essential role of platelet factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Infection and Immunity*. 68, 6355-6361.

Manguikian, A.D., Barbour, S.E., 2004. Cell cycle dependence of group VIA calcium-independent phospholipase A2 activity. *The journal of biological chemistry*. 17, 52881-25892.

Matte, C., Maion, G., Mourad, W., Olivier, M., 2001. *Leishmania donovani*-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis. *Parasite immunology*. 23, 177-184.

Ministério da Saúde: Guia de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília 1991

Mora, R., Valverde, B., Diaz, C., Lomonte, B., Gutierrez, J.M., 2005. A Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. *Toxicon*. 45, 651-660.

Mulherkar, R., Deo, M.G., 1986. Further studies on the enhancing factor and its possible mechanism of action. *Journal of Cell Physiology*. 127,183-188.

Mulherkar, R., Rao, R.S., Wagle, A.S., Patki, V., Deo, M.G., 1993. Enhancing factor, a Paneth cell specific protein from mouse small intestines: predicted amino acid sequence from RT-PCR amplified cDNA and its expression. *Biochemical and biophysical research communications*. 30, 341-352.

Murakami, M., Kambe, T., Shimbara, S., Higashino, K., Hanasaki, K., Arita, H., Horiguchi, M., Arita, M., Arai, H., Inoue, K., Kudo, I., 1999. Different functional aspects of the group II subfamily (Types IIA and V) and type X secretory phospholipase A(2)s in regulating arachidonic acid release and prostaglandin generation. Implications of cyclooxygenase-2 induction and phospholipid scramblase-mediated cellular membrane perturbation *Journal of Biological Chemistry*. 274, 31435-31444.

Muskus, C.E., Villa, M.M., 2002. Metacyclogenesis: un proceso fundamental en la

biología de *Leishmania*. Biomédica, 22:167-177.

Neto, J.P.N.; Basso, G.; Cipoli, A.P.; El Kaedre, L., 1998. American cutaneous leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil – Epidemiology in transformation. Ann Agric Environ Med. 5, 1-5.

Nie, D., Tang, K., Diglio, C., Honn, K.V., 2000. Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase. Blood. 95, 2304-2311.

Noronha, F.S., Cruz, J. S., Beirao, P.S., Horta, M. F., 1996. Macrophage damage by *Leishmania amazonensis* cytolyisin: evidence of pore formation on cell membrane. Infection and Immunity. 68, 4578-4584.

Nourbakhsh, F., Uliana, S.R., Smith, D.F. Characterisation and expression of a stage-regulated gene of *Leishmania major*. Molecular and biochemical parasitology. 1996;76(1-2):201-13.

Prijateli, P., Charnay, M., Ivanovski, G., Jenko, Z., Pungercar, J. Krizai, I., Faure, G., 2006. The C-terminal and beta-wing regions of ammodytoxin A, a neurotoxic phospholipase A2 from *Vipera ammodytes ammodytes*, are critical for binding to factor Xa and for anticoagulant effect. Biochimie. 88, 69-76.

Peres, C.M., Otton, R., Curi, R., 2005. Modulation of lymphocyte proliferation by macrophages and macrophages loaded with arachidonic acid. Cell Biochemical Functional. 23, 373-81.

Perez-Santos, J.L., Talamás -Rohana, P., 2001. In vitro indomethacin administration upregulates interleukin-12 production and polarizes the immune response towards a Th1 type in susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania mexicana*. Parasite Immunology. 23, 599-606

Ponce-Soto, L.A., Toyama, M.H., Hyslop, S., Novello, J.C., Marangoni S., 2002. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA2 from *Crotalus durissus collilineatus* venom. Journal of protein chemistry. 21, 131-136.

Poot, J. Roger, M.E., Bates, P.A., Vermeulen, A., 2005. Detailed analysis of an experimental challenge model for *Leishmania infantum* (JPC strain) in dogs. Veterinary Parasitology, 130-41-53.

Rangel-Santos, A., Dos-Santos, E.C., Lopes-Ferreira, M., Lima, C., Cardoso,

D.F., Mota, I., 2004. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Toxicon*, 43, 801–810.

Rath, S., Trivelin, L.A., Imbrunito, T.R., Tomazela, D.M., Jesús, M.N., Marzal, P. C., Andrade-Junior, H.,F., Tempone, A.T., 2003. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado de arte. *Química Nova*. 26, 550-555.

Sadigursky, M., Brodskyn, C.I., 1986. A new liquid medium without blood and serum for culture of hemoflagellates. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 35, 942-954.

Saffer, L.D., Long Krug, S.A., Scharzman, J.D., 1989. The role of phospholipase in host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *The American Journal of Tropical medicine and Hygiene*. 40, 145-149.

Sampaio, S.C.; Sousa e Silva, M.C.C., Borelli, P., Cury, C., Cury, Y., 2001. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. *Journal of Leukocyte Biology*. 70, 551-558.

Sampaio, S.C., Alba-Loureiro, T.C., Brigatte, P., Landgraf, R.G., Dos Santos, E.C., Curi, R., Cury, Y., 2006. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. *Toxicon*. 47, 313-321.

Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med*.; 168 , 1675-84.

Squier, M.K., Sehnert, A.J., Cohen, J.J., 1995. Apoptosis in leukocytes. *Journal of Leukocytes Biology*. 57.2-10.

Sucen, 2004. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana no município de Ubatuba, litoral de São Paulo, Brasil, 1993-2003. *Revista de Saúde Pública*. 38, 331-332

Singh, R.K., Ethayathulla, A.S., Jabeen, T., Sharma, S., Kaur, P., Singh, T.P., 2005. Aspirin induces its anti-inflammatory effects through its specific binding to

phospholipase A2: crystal structure of the complex formed between phospholipase A2 and aspirin at 1.9 angstroms resolution. *Journal of Drugs Target*. 13, 113-119.

Six, A.D.; Dennis, A.E., 2000. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1-19.

Stambuk, B.U.; Batista, A.S., De Araújo, P.S., 2000. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioscience and bioengineering*. 89, 212-224.

Triggiani, M., Granata, F., Giannattasio, G., Marone, G., 2005. Secretory phospholipases A2 in inflammatory and allergic diseases: not just enzymes. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 116, 1000-1006.

Tsai, I.H., Wang, Y.M., 1998. Effect of site directed mutagenesis on the activity of recombinant trimucrotoxin, a neurotoxic phospholipase from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *Toxicon*. 36, 1591-1597.

Toyama MH, de Oliveira DG, Beriam LO, Novello JC, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S., 2003. Structural, enzymatic and biological properties of new PLA(2) isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*. 41,1033-1048.

Valentin, E., Lambeau, G., 2000. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A2 and their receptors and binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 31,59-70.

van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., Laskay, T., 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *Journal of Immunology*. 173, 6521-6535.

Venuprasad, K., Banerjee, P.P., Chattopadhyay, S., Sharma, S., Pal, S., Parab, P.B., Mitra, D., Saha, B., 2002. Human neutrophil-expressed CD28 interacts with macrophage B7 to induce phosphatidylinositol 3-kinase-dependent IFN-gamma secretion and restriction of *Leishmania* growth. *Journal of Immunology*. 169, 920-8.

Weerasinghe, G.R., Coon, S.L., Bhattacharjee, A. K., Harry, G.J., Bosetti, F., 2006. Regional protein levels of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 in Rhesus monkey brain as a function of age. *Brain Research Bulletin*. 31, 614-621.

Wiese, A., Brandenburg, K., Lindner, B., Schromm, A.B., Carroll, S.F., Rietschel, E.T., Seydel, U., 1997. Mechanisms of action of the bactericidal/permeability-increasing protein BPI on endotoxin and phospholipid monolayers and aggregates. *Biochemistry* 36, 10301–10310.

Woodruff, T.M., Arumugam, T.V., Shiels, I.A., Newman, M.L., Ross, P.A., Reid, R.C., Fairlie, D.P., Taylor, S.M., 2005. A potent and selective inhibitor of group IIa secretory phospholipase A2 protects rats from TNBS-induced colitis. *International Immunopharmacology*.5, 883-892.

Wright, S.D., Silverstein, S.C. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *Journal of experimental medical sciences*.. 1983 1;158(6):2016-23.

Yao, C., Donelson, J.E., Wilson, M.E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Molecular & Biochemical Parasitology* 132 (2003) 1–16.