



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EFEITOS DA FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS EM
Leishmania (L.) amazonensis

ALINE FELIZARDO MAGRE

Salvador - Bahia - Brasil

2005



001982

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

EFEITOS DA FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS EM

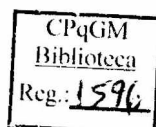
Leishmania (L.) amazonensis

ALINE FELIZARDO MAGRE

Professor-orientador: **Marcos André Vannier dos Santos**

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Patologia para a
obtenção do grau de mestre em Patologia
Experimental.

Salvador – Bahia, 2005.



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM /FIOCRUZ
Salvador - Bahia.

Magre, Aline Felizardo
M212s Efeito da Fosforilação de Proteínas em *Leishmania (L.) amazonensis* [manuscrito].
/ Aline

Felizardo Magre. - 2005.
91 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de
Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2005.

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Vannier dos Santos. Laboratório
de Microscopia Eletrônica.

1. *Leishmania amazonensis*. 2. Biologia celular. 3. Parasitologia. I. Título.

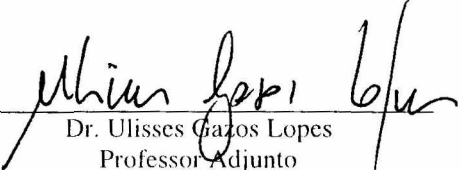
CDU 599.323.4:576

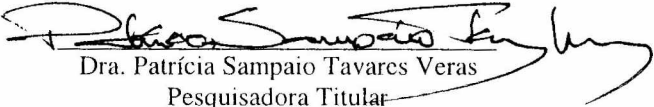
EFEITOS DA FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS EM *Leishmania (L.) amazonensis*

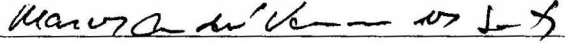
ALINE FELIZARDO MAGRE

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA


Dr. Ulisses Gazos Lopes
Professor Adjunto
UFRJ


Dra. Patricia Sampaio Tavares Veras
Pesquisadora Titular
CPqGM-FIOCRUZ


Dr. Marcos André Vannier dos Santos
Pesquisador Titular
CPqGM-FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

A Deus, que com sua infinita sabedoria me trouxe até Salvador e me deu a oportunidade de crescer na carreira que escolhi...

Aos meus pais, Antonio Magre e Alair Felizardo Magre, os melhores pais que existem, e à minha irmã, Amanda, que sempre me incentivaram e apoiaram para que eu seguisse em frente. **Amo muito** vocês...

À minha **amada** “dinda” Denize, que mesmo à distância não deixou de se preocupar, me incentivar e aconselhar nessa difícil jornada que é ser (quem sabe um dia) pesquisadora. “Dinda” você é muito especial para mim...

À minha “vozinha” Josefa, que está quase “morrendo” de saudades pedindo para eu voltar logo...

Ao meu querido cunhado “**moreco**” (Anníbal Jr), por ter feito companhia à minha irmã durante minha ausência. Afinal de contas, você tinha que servir pra alguma coisa, né? Bjs **moreco**...

Ao meu orientador Marcos André, que me deu a oportunidade de vir estudar nesse centro de pesquisas e fazer o mestrado. Sempre com muita (muita mesmo) paciência e empolgação transmitiu conhecimento, experiência de vida e cultura geral. Saiba que, apesar de você achar que não, tenho muita consideração e admiração por você “Chefe”. Muito obrigado mesmo!

À Adriana, sempre prestativa e bem humorada... Obrigada por sua paciência e ajuda!

À Karlinha, minha amiga mais “meiga”, parceira de “balada”, praia e de “Iguatemi”. Aos poucos fomos nos conhecendo melhor e nos tornando muito amigas... Obrigada por sua companhia e amizade sincera, conte sempre comigo...

À Vanna, sempre com uma alegria contagiante, ótima companhia de “happy hour” é a mais nova empresária de Salvador no ramo das “bijoux” (lindíssimas - comprei várias). Nossos papos na hora do café e nossos comentários sempre muito pertinentes ficarão sempre em minhas lembranças... Não poderia faltar, de forma alguma, nossos encontros em "bigode", o "point de Brotas" Adorei te conhecer, amiga, sempre estarei por perto... E claro, na casa de alguém (sua ou de Lalá)!!!!

À Cris, uma figura à parte! Com essa carinha de boneca, aparentemente comportada, tão santinha... Que nada... Com suas observações sempre adequadas e inesperadas... Quem não te conhece até acredita! Foi ótimo conviver com você. Sentirei saudades.

À Vanessa Menezes, Debby, Mayara, Lourdes, SÍntia, Mara, Eagles e Rafael (“e aí gatinha?”), a convivência diária, sempre muito divertida foi fundamental para o desenvolvimento desse trabalho. Nunca vou esquecer de vocês “coleguinhas”..

Ao Diego **Silva** Menezes, meu companheiro de “informações super úteis”, que além de toda a ajuda no lab também fez o “trabalho sujo” no biotério (brincadeirinha...). “Digão”, você é uma pessoa muito especial, um bom amigo, conte comigo para o que você precisar (quase tudo). Obrigada pela imensa ajuda e pelas conversas!

À minha “super amiga” e confidente Elis, que durante todo esse período me compreendeu, sempre esteve disposta a me ouvir (e foram muitas às vezes que precisei de seus ouvidos) e ajudar no possível. Saiba que sentirei muitas saudades, mas pode deixar que qualquer problema impossível que eu tenha que apareça, adivinhe: eu te ligo...

À Beth, a pessoa mais cara-de-pau, humilde (para não dizer o contrário) e divertida que já conheci! Vou sentir sua falta.

À minha amiga Déia, que apesar dos contratempos me ajudou bastante. Recuperamos nossa amizade e é isso que importa, afinal de contas o que não mata fortalece!!!

Ao Cláudio, “olha só”, pelas caronas até o Extra, pelas brincadeiras, por ajudar a recuperar parasitos e pelo apoio técnico. Obrigada pelas inúmeras vezes que cortou material para mim também!

À Ana Fiscina, bibliotecária do CPqGM, uma pessoa muito prestativa e gentil. Obrigada por sua ajuda nessa reta final.

Ao Hugo (CVDC), por tantas vezes ter me ajudado com o processamento das imagens.

À Taís (LPBI), pela paciência e boa vontade em me ajudar com a densitometria do gel e das membranas.

Às secretarias da Coordenação da Pós – graduação: Dona Rosália, Iumara, Roberta, Lana e Thaise, pela paciência, disponibilidade para resolver as pendências e simpatia de sempre.

À minha gata mais velha Laka, que não pôde vir para Salvador. Estou morrendo de saudades...

À minha gata mais nova, soteropolitana legítima e mais do que companheira Milka, sempre me animando, brincando de “esconde e pega”, muitas vezes dormindo em cima dos meus livros e dos trabalhos que eu tinha que ler... Só você sabe como foi difícil esse período que tivemos que estar longe de casa, mas o importante é que conseguimos. Tudo deu certo...

Às minhas lindas e esbeltas formas promastigotas, sem vocês esse trabalho não poderia ter sido realizado.

Aos vários camundongos e hamsters do biotério do CPqGM, que de forma “voluntária” doaram suas vidas em nome da ciência, **eu** encontrarei vocês no céu, já o Diego...

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACTS

1 INTRODUÇÃO

1.1 As leishmanioses	11
1.2 Diagnóstico e tratamento	17
1.3 O parasito	18
1.4 Desenvolvimento no hospedeiro invertebrado	22
1.5 Desenvolvimento no hospedeiro vertebrado	25
1.6 Interação parasito-célula hospedeira	28
1.7 Sinalização celular na infecção	31
1.8 Sinalização celular em tripanossomatídeos	34

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral	39
2.2 Objetivos específicos	39

3 JUSTIFICATIVA

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção de formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	41
4.2 Medidas de proliferação celular	41
4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida	41
4.4 “Western blotting”	42

4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão	42
4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura	43
4.7 Dosagem de atividade fosfatase ácida	43
4.8 Citoquímica para detecção de fosfatase ácida	44
4.9 Cultivo primário de macrófagos	44
4.10 Ensaio de interação e sobrevivência	45
4.11 Inibidores	46
4.12 Análise estatística	47
5 RESULTADOS	48
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AcP	fosfatase ácida
AMP _c	adenosina monofosfato cíclico
ATP	adenosina trifosfato
BF	Bolsa Flagelar
${}_i[Ca^{2+}]$	Concentração intracelular de cálcio livre
CaMK	Cinase dependente de calmodulina
DAG	Diacilglicerol
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
FcR	Receptor para porção Fc de imunoglobulina
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GIPLs	Glicosilfosfoinosítídeos lipídeos
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IFN- γ	Interferon gamma
IGF	Fator de Crescimento semelhante à Insulina
IL	Interleucina
IP ₃	Inositol trifosfato
JAK	Janus Cinase
kDNA	DNA do Cinetoplasto
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano

LPS	Lipopolissacarídeo
LV	Leishmaniose Visceral
MAPK	Cinase ativada por mitógeno
MARCK	Substrato de cinase C miristoilado rico em alanina
MBP	Proteína ligante de manose
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
MRP	Proteína relacionada a MARCKS
PIP ₂	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PKA	Proteína Cinase dependente de AMP _c
PKC	Proteína Cinase dependente de Cálcio
PLC	Fosfolipase C
PTK	Proteína Tirosina Cinase
μPPG	Proteofosfoglicano filamentoso
STAT	Fator de Transcrição e Transdutor de Sinal
SDS-PAGE	Eletrofore em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
TGF-β	Fator de Crescimento Tumoral β
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α

RESUMO

EFEITOS DA FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS EM *Leishmania (L.) amazonensis*. **ALINE FELIZARDO MAGRE.** *Leishmania* spp. são protozoários parasitas causadores de várias patologias humanas, que incluem desde úlceras cutâneas simples, com resolução espontânea, até comprometimento visceral, potencialmente fatal. O ciclo de vida do parasito apresenta duas formas evolutivas e numerosos morfotipos. A diferenciação durante o ciclo evolutivo do parasito é induzida por modificações no microambiente e é controlada, entre outros fatores, por um complexo balanço entre fosforilação e defosforilação de proteínas específicas, principalmente em resíduos de tirosina, serina e treonina. Ao contrário de células de mamíferos, pouco se conhece a cerca das cascatas de sinalização de protozoários. Nesse estudo foram testados os efeitos dos inibidores de proteína cinases estaurosporina, genisteína e tirfostina 25 na proliferação *in vitro* de *L. (L.) amazonensis*. Concentrações a partir de 1 μ M de estaurosporina resultaram no completo bloqueio do crescimento celular. Genisteína (10-100 μ M) e tirfostina 25 (50-150 μ M) inibiram o crescimento de forma dose-dependente. O perfil eletroforético dos parasitos tratados não revelou modificações significativas na expressão de proteínas, mas a fosforilação em resíduos de tirosina e serina foi diminuída. A análise por microscopia eletrônica de transmissão dos parasitos revelou alterações na morfologia mitocondrial, no empacotamento do kDNA, no número de corpúsculos basais e flagelos e, em algumas células, um grande aumento no volume da bolsa flagelar, sugerindo alterações nas vias endocítica e/ou exocítica. Com o objetivo de abordar tais vias neste parasito, estudamos bioquimicamente e citoquimicamente a atividade fosfatase ácida. Parasitos tratados com os três inibidores por 1 h e 24 h apresentaram atividade fosfatase ácida secretada significativamente diminuída. Com a finalidade de estudar as vias de sinalização do parasito na interação com a célula hospedeira, promastigotas pré-tratados com os antagonistas foram incubados com macrófagos peritoneais. Observamos que estaurosporina 1 μ M inibiu, de forma significativa, a internalização e a sobrevivência intracelular dos parasitos. Nossos dados sugerem que inibidores de proteína cinases podem exercer efeitos na morfologia, infectividade e proliferação de *Leishmania*, bloqueando o ciclo celular desses parasitos. Palavras chave: *Leishmania*, biologia celular, parasitologia.

SUMMARY

EFFECTS OF PROTEIN PHOSPHORYLATION IN *Leishmania (L.) amazonensis*.

ALINE FELIZARDO MAGRE *Leishmania* spp. are parasitic protozoa that cause a spectrum of human pathologies ranging from simple self-healing cutaneous ulcers to the potentially fatal visceral disease. Its life cycle includes two distinct developmental forms and several morphotypes. Differentiation during parasite life cycle is induced by modifications on environment and is controlled by factors such as a complex balance between phosphorylation and dephosphorylation of specific proteins at tyrosine, serine and threonine residues. Contrary to mammalian cells, little is known about protozoa signalling cascades. In this study we tested the effects of protein tyrosine kinase inhibitors staurosporine, genistein and tyrphostin 25 on *L. (L.) amazonensis* *in vitro* growth. Concentrations up to 1 μ M staurosporine completely arrested growth. Genistein (10-100 μ M) and tyrphostin 25 (50-150 μ M) inhibited dose-dependently parasite growth. Electrophoretic profiles of treated parasites revealed no significant change in protein expression, but serine and tyrosine phosphorylations were inhibited. Analysis of treated parasites under the electron microscope revealed alterations in mitochondria morphology, kDNA organization, basal bodies and flagellum number and, in some cells, significant enlargement of the flagellar pocket, suggesting alterations in the endocytic and/or exocytic pathways. To approach these pathways of this parasite, we studied activity biochemically and cytochemically. Parasites treated with all inhibitors for 1 h and 24 hs presented secreted phosphatase acid activity inhibited. To verify the parasites signalling on *Leishmania*-host cell interaction, promastigotes pre-treated with antagonists were incubated with peritoneal macrophages. We observed that 1 μ M staurosporine inhibited internalization and intracellular survival parasites. These data suggest that protein kinase inhibitors may exert effects on *Leishmania* cell architecture and proliferation, blocking thus parasite cell cycle.

Key words: *Leishmania*, cell biology, parasitology.

1 INTRODUÇÃO

1.1 As leishmanioses

As leishmanioses resultam do parasitismo intracelular de hospedeiros vertebrados por protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, os quais apresentam ampla distribuição geográfica em regiões tropicais e subtropicais. Podem ser consideradas como um conjunto de síndromes com características clínicas, histopatológicas, imunológicas e epidemiológicas distintas.

O grande número de países endêmicos ilustra a importância global da doença. Estima-se que 12-13 milhões de pessoas estejam infectadas e que cerca de 10 % da população mundial encontre-se sob risco de contrair a infecção (DESJEUX, 2004). No Brasil, mais de 30 mil novos casos são registrados anualmente. Segundo Boletim Eletrônico Epidemiológico da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA, 2001), a Bahia é o quinto estado brasileiro em número de casos de leishmaniose (Pará, Maranhão, Ceará e Mato Grosso). Os municípios de Feira de Santana, Jacobina, Irecê e Jequié, a região da Chapada Diamantina e algumas cidades do litoral norte como Camaçari, apresentam numerosos casos registrados da doença. Outro fato preocupante é o crescente número de casos no litoral, onde se localizam diversos complexos turísticos, como a Costa do Sauípe. Jacobina é um dos municípios com maior incidência da forma mais grave, a visceral, no país.

A distribuição geográfica da doença é influenciada por diversos fatores como a distribuição dos vetores e animais reservatórios, modificações climáticas e atividades humanas, incluindo a ocupação de áreas silvestres e desmatamento. Além disso, a migração

de pessoas infectadas de regiões rurais para áreas urbanas, frequentemente de diferentes partes do país, contribuiu significativamente para a propagação da leishmaniose.

O parasito é transmitido durante a hematofagia realizada por insetos dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo). Outras formas de transmissão podem ocorrer com menor frequência. A leishmaniose visceral pode ser transmitida por via congênita (ELTOUM *et al.*, 1992), por transfusão sanguínea (KUBAR *et al.*, 1997), através de hemodiálise (LUZ *et al.*, 1997) e por transplante de órgãos (BERENGUER *et al.*, 1998). A leishmaniose cutânea pode, eventualmente, ser transmitida por contato direto (NUWARI-SALTI & KHANSA, 1985) e por via sexual (SYMMERS, 1960). Diversas espécies de *Leishmania* são conhecidas (Tabela 1), em grande parte zoonóticas. Várias espécies de roedores, cães, entre outros mamíferos, servem de reservatório para os vetores (ASHFORD, 2000).

As manifestações clínicas da leishmaniose dependem de interações entre características de virulência do parasito e a resposta imunológica do hospedeiro. O resultado pode variar desde lesões localizadas na pele, que podem apresentar cura clínica espontânea, ao envolvimento de órgãos como fígado, baço e medula óssea. A leishmaniose é tradicionalmente dividida em três formas principais conhecidas como cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV), entretanto existem formas variantes. Além disso, como verificado na tabela 1, uma única espécie do parasito é capaz de causar diferentes manifestações clínicas. A LC, também conhecida como úlcera de Bauru, botão do Oriente ou ferida brava, é a forma mais encontrada da doença. É causada por diversas espécies do parasito no Velho e no Novo Mundo e caracteriza-se pelo aparecimento de lesões ulcerosas, nodulares ou crostosas, geralmente indolores que podem ser únicas ou múltiplas formadas no local da hematofagia do inseto infectado (HEPBURN, 2000). Essas lesões podem

apresentar resolução espontânea ou persistir por muitos anos. Algumas espécies podem causar uma forma variante conhecida como cutânea difusa (LCD), exemplo extremo da doença, caracterizada por ausência de hipersensibilidade tardia a antígenos parasitários (teste de intradermo-reação ou reação de Montenegro negativa), associada a uma alta carga parasitária. Esta forma é caracterizada por nódulos cutâneos disseminados, não ulcerados, que podem comprometer extensas áreas da pele. Estes nódulos são constituídos praticamente por macrófagos vacuolizados que apresentam grande número de parasitos viáveis, com poucos linfócitos presentes. A produção de IL-2 (interleucina 2) encontra-se bloqueada (MODLIN *et al.*, 1985), não há ativação celular e as infecções respondem pouco ou nada à quimioterapia usual (WALTON, 1989).

A forma mucocutânea, também conhecida como leishmaniose tegumentar americana, caracterizada pelo aparecimento de lesões metastáticas em mucosas, o que pode resultar em desfiguração por ulceração progressiva das mesmas, especialmente nariz e boca. Inicia-se como uma inflamação nasal. O tempo entre o aparecimento da lesão primária e o comprometimento da mucosa é variável, podendo levar diversos anos. As infecções secundárias associadas à LMC são freqüentes e em geral pioram o prognóstico da doença, mas a mortalidade associada a essa forma é baixa.

A leishmaniose visceral, também denominada “Kala-azar” ou “febre negra”, caracteriza-se pelo comprometimento de órgãos profundos. As lesões iniciais costumam se apresentar como pequenas pápulas, que tendem a desaparecer antes que os demais sintomas apareçam. O estado nutricional do indivíduo é um fator importante, pois a desnutrição pode suprimir a resposta imune celular, predispondo ao desenvolvimento da infecção. No decurso da doença, a febre é o sintoma mais importante, por ser constante embora irregular quanto à forma e intensidade, tendo muitas vezes dois picos diários (PEARSON &

SOUSA, 1996). Também são observadas perturbações no apetite e emagrecimento que conduzem, progressivamente, a um estado de desnutrição grave, hepato-esplenomegalia e trombocitopenia (GRIMALDI JUNIOR & MCMAHON-PRATT, 1991). Essa forma da doença pode ser fatal, mesmo quando o tratamento adequado é administrado, pois pode haver resistência aos quimioterápicos.

Segundo dados da OMS, a co-infecção *Leishmania*-HIV está emergindo de maneira preocupante. Cerca de 17 milhões de pessoas estão infectadas pelo vírus e, aproximadamente, um terço delas vivem em áreas onde a leishmaniose é endêmica. Com a disseminação da AIDS, a LV tem aumentado sua prevalência (OLIVIER *et al.*, 2003; PAREDES *et al.*, 2003), assim como manifestações não usuais, tais como lesões gastrointestinais, cerebrais e pulmonares. A reativação de casos assintomáticos também é comum em indivíduos co-infectados (PINTADO & LOPEZ-VELEZ, 2001). O parasito também pode ser transmitido pelo uso de agulhas contaminadas, o que geralmente acontece entre usuários de drogas, que constituem um grupo de risco para a co-infecção (DESJEUX & ALVAR, 2003). A associação dessas doenças produz uma deficiência cumulativa da resposta imune do hospedeiro, uma vez que ambos os patógenos são capazes de subverter a resposta imunológica do hospedeiro. Além disso, indivíduos co-infectados frequentemente são refratários ao tratamento, agravando o prognóstico (LOPEZ-VELEZ *ET al.*, 1998).

Tabela I: Manifestações clínicas da leishmaniose e sua distribuição geográfica.

Manifestações clínicas	Espécies	Localização
Leishmaniose visceral		
Kala-azar: envolvimento generalizado do sistema reticulo-endotelial (baço, medula óssea e fígado)	<i>L. (L.) donovani</i> <i>L. (L.) infantum</i> ** <i>L. (L.) donovani</i> (<i>archibaldi</i>) <i>L. (L.) chagasi</i> ** <i>L. (L.) amazonensis</i> *	Índia, China, Paquistão e Nepal litoral mediterrâneo, Balcãs, Ásia, China, Norte da África (Saara) Sudão, Quênia, Etiópia, Quênia, Etiópia, Somália América Latina Brasil Israel, Índia, Arábia Saudita (tropas americanas)
Leishmaniose cutânea do Velho Mundo		
Lesões cutâneas únicas ou em pequeno número	<i>L. (L.) major</i> <i>L. (L.) tropica</i> <i>L. (L.) aethiopica</i> <i>L. (L.) chagasi</i> <i>L. (L.) donovani</i>	China, Índia, Paquistão, África litoral mediterrâneo, Ásia, Índia Etiópia, Quênia, Iêmen litoral mediterrâneo Sudão e leste da África Quênia, Etiópia, Somália
Leishmaniose cutânea difusa	<i>L. (L.) aethiopica</i>	Etiópia, Quênia, Iêmen
Leishmaniose cutânea do Novo Mundo		
Lesões cutâneas únicas ou em pequeno número	<i>L. (L.) mexicana</i> (úlceras de chiclero) <i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) pifanoi</i> <i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i>	América Central (Belize, Guatemala, Honduras e Costa Rica), México e Texas (EUA) Brasil (especialmente regiões Norte e Nordeste), Bolívia, Colômbia, Paraguai, Guiana Francesa América Central, Venezuela, México América do Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Paraguai, Peru, Venezuela) e Central (Belize, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Panamá, Suriname)

	<i>L. (V.) peruviana (uta)</i> <i>L. (V.) panamensis</i> <i>L. (V.) garnhami</i> <i>L. (V.) venezuelensis</i> <i>L. (V.) colombiensis</i> <i>L. (V.) lainsoni</i> <i>L. (V.) shawi</i> <i>L. (V.) naiffi</i> <i>L. (L.) chagasi</i>	Guiana, Suriname, Brasil (Norte) Peru (Andes), Argentina Panamá, Costa Rica, Equador, Venezuela, Colômbia, Nicarágua, Honduras Venezuela (Andes) Venezuela Colômbia, Venezuela e Panamá Brasil (bacia Amazônica) Brasil (Norte) Brasil (Amazonas e Pará) América do Sul e Central
Leishmaniose cutânea difusa	<i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) pifanoi</i> <i>L. (L.) mexicana</i>	Brasil (regiões Norte e Nordeste) Venezuela México e América Central República Dominicana
Leishmaniose mucocutânea	<i>L. (V.) braziliensis</i> (espúndia)	América Latina

Adaptado de Pearson & Sousa, 1996.

* Casos de leishmaniose visceral por *L. (L.) amazonensis* só foram diagnosticados no estado da Bahia, Brasil (BARRAL *et al.*, 1991); (*L.*) = subgênero *Leishmania*; (*V.*) = subgênero *Viannia*; (?) espécie não identificada.

** Alguns autores (como FELICIANGELI *et al.*, 2005, CAMPOS-PONCE *et al.*, 2005) consideram sinonímia.

1.2 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da leishmaniose envolve a análise de sinais clínicos e técnicas laboratoriais. A visualização dos parasitos sob microscopia óptica, a partir de material obtido por punção ou biópsia de bordas de lesão assegura o diagnóstico. O material coletado pode ser cultivado em meios como Warren (infusão de cérebro e coração bovinos, hemina e ácido fólico) e NNN para crescimento dos parasitos. O xenodiagnóstico (inoculação do material coletado do paciente em animal susceptível como hamster) pode ser utilizado, embora o resultado seja bastante demorado (GRIMALDI JUNIOR & MCMAHON-PRATT, 1991). O teste intradérmico de Montenegro também é muito utilizado, mas este não se aplica em casos cuja suspeita seja a forma visceral ou cutânea difusa, uma vez que apresentam resposta imune celular anérgica. Testes sorológicos, como ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) e a imunofluorescência, são utilizados para a pesquisa de anticorpos contra o parasito podendo diagnosticar as diferentes formas clínicas da leishmaniose (GRIMALDI JUNIOR & TESH, 1993). Além disso, a amplificação de genes do parasito pode ser realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR, SINGH *et al.*, 2005).

O tratamento das leishmanioses baseia-se principalmente no uso de compostos antimoniais pentavalentes como estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) e antimoniato de N-meglumina (Glucantime[®]). Os antimoniais inibem a síntese de ATP nas formas amastigotas através da inibição da glicólise e da β -oxidação de ácidos graxos. Para casos em que há contra-indicação desses medicamentos ou para casos refratários, utiliza-se anfotericina B ou pentamidina (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998; revisto em OUELLETTE

et al., 2004). Estas drogas são consideravelmente tóxicas para o paciente e requerem acompanhamento médico rigoroso.

1.3 O Parasito

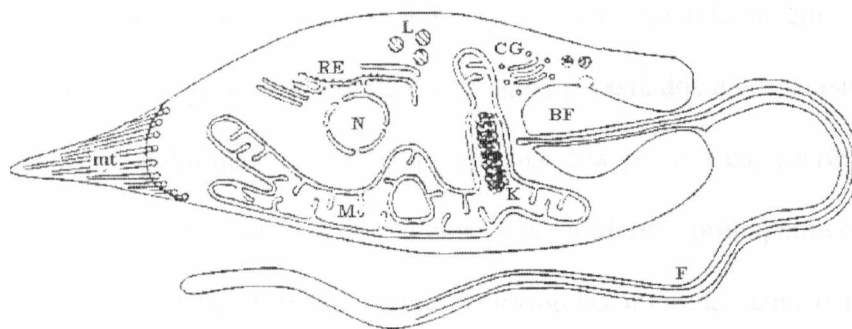
Os parasitos do gênero *Leishmania* foram descritos de forma independente por William Leishman e Charles Donovan em 1903 e o taxon foi proposto no mesmo ano, por James Wright. Esses parasitos apresentam duas formas evolutivas em seu ciclo de vida. A forma promastigota (Fig. 1 A) é encontrada no hospedeiro invertebrado, apresenta de 12 a 20 µm de comprimento, formato alongado e um longo flagelo anterior, com estrutura habitual de nove pares de microtúbulos dispostos em círculo mais um par central que emerge da bolsa flagelar (BF, VANNIER-SANTOS *et al.*, 2002). Dentre os promastigotas ainda diferenciamos diversos morfotipos que se diferem quanto à morfologia e infectividade (BATES, 1994). Promastigotas passam por um intenso processo de diferenciação celular, denominado metaciclo-gênese que resulta no desenvolvimento de uma forma não proliferativa, altamente infectiva, denominada promastigota metacíclico (SACKS, 1989; VANNIER-SANTOS *et al.*, 2002). Esta forma caracteriza-se pela presença de um longo flagelo, corpo celular pequeno e delgado. Ao longo da metaciclo-gênese ocorrem alterações morfológicas e bioquímicas, incluindo expressão e atividade de moléculas de superfície, entre essas a glicoproteína de superfície, gp63 e o lipofosfoglicano (LPG). O LPG desempenha importante papel na sobrevivência do parasito e na modulação da resposta imune. Diferenças na sua estrutura e distribuição são importantes para as diferentes propriedades que desempenha nos diferentes estágios de desenvolvimento do parasito (DESCOTEAUX & TURCO, 1999; 2002; OLIVIER *et al.*, 2005;). A forma

amastigota (Fig. 1 B), presente apenas no hospedeiro vertebrado, é oval, apresenta de 2 a 4 μm de comprimento e um pequeno flagelo que não emerge da BF. Multiplica-se em células do sistema fagocítico mononuclear como macrófagos e células dendríticas (DE LANGERHANS; ZULUAGA & ROBLEDO, 2004) e fibroblastos (HESPANHOL *et al.*, 2005). Essa forma é responsável pela manutenção e desenvolvimento da doença (LAINSON *et al.*, 1987).

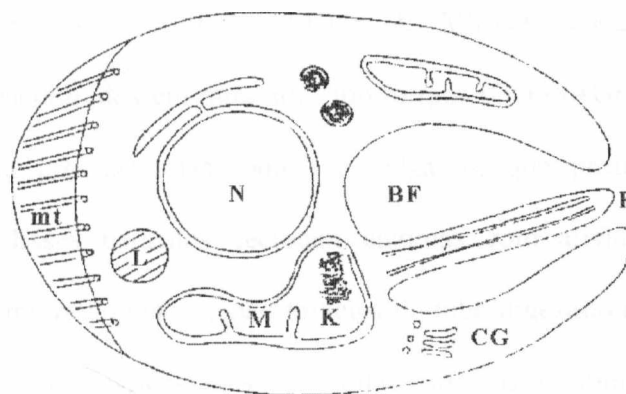
Como toda célula eucariótica, os parasitos apresentam núcleo delimitado por envelope nuclear, sistemas de retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, ribossomas, lisossomas, inclusões lipídicas e vacúolos. Os parasitos possuem uma camada organizada de microtúbulos logo abaixo da membrana plasmática denominada microtúbulos subpeliculares, que se estende por todo o corpo celular e termina próximo à BF, onde se encontram apenas 4 microtúbulos que participam do transporte vesicular (MARTINY & VANNIER-SANTOS, 2005; PIMENTA & DE SOUZA, 1987). Possuem uma única mitocôndria, que se estende por todo o corpo celular, a qual contém uma condensação de DNA (kDNA), localizada em uma região próxima à base do flagelo, denominada cinetoplasto (revisto em VANNIER-SANTOS *et al.*, 2002; MARTINY & VANNIER-SANTOS, 2005). Todos os tripanossomatídeos possuem uma região conhecida como BF, encontrada na região anterior da célula, formada por uma invaginação da membrana plasmática, a qual estabelece continuidade direta com a membrana do flagelo e é o único sítio onde ocorrem processos endocíticos e exocíticos em *Leishmania* (LANDFEAR & IGNATUSHCHENKO, 2001). Os parasitos também apresentam uma organela esférica, delimitada por membrana e variável em número, denominada acidocalciossoma. Essa organela ácida armazena cálcio, além de apresentar elementos como fósforo, magnésio, sódio, zinco e pequenas quantidades de cloro, potássio e enxofre (DOCAMPO &

MORENO, 1999, 2001). Além de liberar grandes quantidades de Ca^{+2} para os eventos de sinalização celular, essas organelas estão envolvidas na homeostase de pH e osmorregulação nesses parasitos. Uma outra organela característica de tripanossomatídeos é o glicossoma, envolvida na geração glicolítica de ATP e que também participa da oxidação de ácidos graxos, biossíntese de pirimidina e purina, além de possuir pelo menos duas isoformas da enzima superóxido dismutase, contribuindo nos mecanismos detoxificantes (MOYERSOEN *et al.*, 2004).

As formas amastigotas de espécies pertencentes ao complexo *Leishmania mexicana* apresentam organelas delimitadas por membrana, ricas em cisteína proteinase, denominadas megassomas (CLAYTON *et al.*, 1995). Estas organelas estão associadas ao acúmulo e possível degradação de macromoléculas endocitadas (DUBOISE *et al.*, 1994; MARTINY & VANNIER-SANTOS, 2005; VANNIER-SANTOS *et al.*, 2002).



A



B

Figura 1: Comparação esquemática entre a forma promastigota (A) e amastigota (B) de *Leishmania*. N, núcleo; mt, microtúbulos subpeliculares; M, mitocôndria; K, cinetoplasto; L, lisossoma; CG, complexo de Golgi; BF, bolsa flagelar; F, flagelo. Adaptado do livro Parasitologia, Rey, 2001.

1.4 Desenvolvimento no hospedeiro invertebrado

A infecção do inseto ocorre quando a fêmea realiza hematofagia em vertebrado infectado e, juntamente com o sangue, ingere macrófagos parasitados e/ou parasitos livres. O repasto sanguíneo é delimitado por uma membrana dita peritrófica, secretada pelas células epiteliais intestinais que consiste de proteínas e carboidratos, principalmente quitina (KILLICK-KENDRICK, 1990a; 1990b). Formas amastigotas ingeridas com o repasto se diferenciam em promastigotas não infectivos, procíclicos, no intestino do vetor e cerca de 7-8 dias após terem sido ingeridos diferenciam-se em uma forma altamente virulenta, promastigota metacíclico (SACKS & PERKINS, 1984; 1985). Durante esse período, os parasitos sofrem diversas modificações morfológicas e bioquímicas, fenômeno denominado metaciclogênese, que origina as formas promastigotas metacíclicas, não proliferativas e altamente virulentas (SACKS, 1989; MUSKUS & VILLA, 2002). Promastigotas procíclicos podem ser encontrados em diferentes morfotipos (GOSSAGE *et al.*, 2003). As formas nectomonas são promastigotas longos e delgados, que proliferam dentro da membrana peritrófica. Esses parasitos secretam enzimas com atividade quitinolítica, rompem a membrana e migram para a região torácica do tubo digestivo e válvula cardíaca do inseto, onde aderem às microvilosidades das células epiteliais por meio de seus flagelos via junções do tipo desmossomos e receptores (SCHLEIN, 1993; VANNIER-SANTOS *et al.*, 2002). Essa formas podem se diferenciar em metacíclicos ou em uma forma menor e menos delgada, haptomonas, que migram para esôfago e faringe, onde se transformam em paramastigotas, uma forma muito menor que apresenta o cinetoplasto ao lado do núcleo (SCHLEIN, 1993; VANNIER-SANTOS *et al.*, 2002) e estes em metacíclicos, mais curtos e delgados e com flagelos proporcionalmente mais longos. Promastigotas metacíclicos,

presentes em grande número, secretam um polímero filamentososo do tipo mucina, proteofosfoglicano (PPG), que causa oclusão do lúmen intestinal do inseto, esôfago e faringe, dificultando a ingestão de sangue. Após cada novo repasto sanguíneo o relaxamento dos músculos responsáveis pela sucção provoca o refluxo dos parasitos, que são inoculados em novo hospedeiro (SCHLEIN, 1993).

Além das modificações morfológicas, alterações bioquímicas também são observadas. Promastigotas procíclicos expressam grandes quantidades de LPG e gp63 (DAVIES *et al.*, 1990; PIMENTA *et al.*, 1991). O LPG é o principal glicoconjugado de superfície das formas promastigotas. Trata-se de um glicolípídeo com repetidas unidades sacarídicas fosforiladas ligadas por pontes de monofosfato e conectadas a um “esqueleto” glicídico. Essa estrutura encontra-se ancorada à membrana do parasito por um glicosilfosfatidilinositol (GPI). Modificações na estrutura do LPG são responsáveis pela incapacidade dos metacíclicos em aderir às microvilosidades do intestino (DILLON & LANE, 1999), permitindo a migração para o intestino anterior (PIMENTA *et al.*, 1992; SACKS *et al.*, 1994, 2000) e peças bucais do inseto. O LPG apresenta papel minoritário na proteção do parasito durante a digestão do repasto sanguíneo (SACKS *et al.*, 2000), mas provavelmente é relevante na sobrevivência em um ambiente rico em hemoglobina, agindo na retirada de radicais livres (MARTINY & VANNIER-SANTOs, 2005). A transformação em metacíclicos resulta em mudanças na estrutura do LPG (TURCO & DESCOTEAUX, 1992; SACKS *et al.*, 1985; SARAIVA *et al.*, 1995), no conteúdo enzimático (MALLISON & COOMBS, 1989; MOTTRAM *et al.*, 1998) e na expressão de gp63 (PIMENTA *et al.*, 1991), dependendo da espécie do parasito. Promastigotas metacíclicos também expressam em sua superfície altos níveis de gp63, a glicoproteína de superfície mais abundante em promastigotas. Também conhecida como protease de superfície de *Leishmania*, ou

leishmanolisina, é uma metaloproteinase que se encontra ancorada à membrana plasmática via glicosilfosfatidilinositol (BORDIER, 1987; OLIVIER *et al.*, 2005). É responsável pela degradação de várias moléculas do hospedeiro, como imunoglobulinas, proteínas do complemento (BRITTINGHAM *et al.*, 1995) e moléculas CD4 de células T humanas (HEY *et al.*, 1994). Ela também auxilia na sobrevivência do parasito no intestino do vetor, degradando hemoglobina livre (CHAUDHURI & CHANG, 1988) e protegendo contra ação de enzimas hidrolíticas (CUNNINGHAM, 2001; YAO *et al.*, 2003). Promastigotas infectivos também expressam atividade fosfatase ácida (AcP) aumentada e cisteíno proteinase (BATES *et al.*, 1994). As AcPs de *Leishmania* são fosfomonoesterases com capacidade de hidrolisar diversos substratos em pH ótimo próximo de 5,0, mas ainda com atividade parcial em pH fisiológico. Pode apresentar-se ligada à membrana ou pode ser secretada (SAcP) (DOYLE & DWYER, 1993). A AcP de *Leishmania (L.) donovani* é a melhor caracterizada (BATES *et al.*, 1987; GOTTLIEB & DWYER, 1982; LIPPERT *et al.*, 1999; LOVELACE & GOTTLIEB, 1986). Essa enzima é constitutivamente produzida e liberada no meio extracelular, por promastigotas, além de ser estruturalmente conservada entre as diferentes espécies do parasito. Tanto a forma secretada quanto a de membrana foram correlacionadas à virulência do parasito (KATAKURA & KOBAYASHI, 1988; SINGLA *et al.*, 1992).

1.5 Desenvolvimento no hospedeiro vertebrado

Leishmania apresenta estratégias e mecanismos de escape complexos, os quais permitem sua sobrevivência diante das defesas no ambiente hostil de seu novo hospedeiro. Este é infectado quando formas promastigotas metacíclicas são inoculadas pelos flebotomíneos. Componentes da saliva do vetor influenciam na infecção. Vários trabalhos demonstraram que a saliva exacerba a leishmaniose experimental por inibir respostas microbicidas (ALMEIDA *et al.*, 2003; HALL & TITUS, 1995;) e apresentação de antígenos (THEODOS & TITUS, 1993). A maioria dos componentes salivares ainda não foi identificada, mas dentre os já conhecidos destaca-se o maxadilan, um peptídeo vasodilatador potente que inibe eventos pró-inflamatórios, como indução da síntese de IL-6 e IL-12 e produção de TNF- α (fator de necrose tumoral) no hospedeiro (QURESHI *et al.*, 1996; SOARES *et al.*, 1998). No hospedeiro vertebrado, o parasito prolifera principalmente em células do sistema fagocítico mononuclear como macrófagos (CHANG, 1983), em fibroblastos (BOGDAN *et al.*, 2000) e células dendríticas (Langerhans) residentes na pele (MOLL, 1993). Vários sistemas receptor-ligante são implicados na adesão e internalização dos parasitos por macrófagos (ALEXANDER & RUSSELL, 1992; CHANG, 1983). É importante ressaltar que nesse processo diversos ligantes podem ser reconhecidos por um número restrito de receptores, os quais podem cooperar para uma infecção eficiente. Dentre os vários sistemas, os receptores para o sistema complemento (CRs) parecem desempenhar papel importante na internalização de diferentes espécies de *Leishmania* (MOSSER & ROSENTHAL, 1993). Após a inoculação no hospedeiro vertebrado, os promastigotas metacíclicos novamente sofrem alterações morfológicas e bioquímicas, induzidas especialmente por diferenças de temperatura e pH (VIEIRA *et al.*, 2002; ZILBERSTEIN &

SHAPIRA, 1994) e se diferenciam para um estágio mais adaptado à sua sobrevivência, a forma amastigota. Na célula hospedeira, amastigotas são encontrados em vacúolos ditos parasitóforos, os quais se fundem com endossomas tardios originando os fagolisossomas (DESJARDINS, 1995). Cerca de 30 min. após sua formação, o vacúolo se torna ácido, com pH entre 4,5-5,0, mas próton-ATPases na membrana do parasito mantém seu pH citoplasmático neutro (VANNIER-SANTOS *et al.*, 2002). Dentro desses vacúolos os amastigotas se multiplicam intensamente até que rompem o macrófago e são liberados no tecido, onde podem ser rapidamente fagocitados por novas células (CHANG, 1983).



Figura 2: Ciclo biológico de *Leishmania*. O hospedeiro invertebrado é infectado durante o repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado infectado ingerindo formas amastigotas (g). Estas se diferenciam em promastigotas procíclicos no intestino médio, se diferenciam em promastigotas metacíclicos e migram para as porções anteriores do estômago (a). O hospedeiro vertebrado é infectado pela inoculação de formas metacíclicas através da hematofagia (b). Estas são captadas por células do sistema mononuclear fagocítico, principalmente macrófagos, na derme (c). Dentro de fagolisossomas na célula hospedeira o parasito se diferencia em amastigota (d) e prolifera até o rompimento da célula (e). Formas amastigotas livres podem infectar novas células (f) ou serem ingeridas em repasto (g), reiniciando o ciclo. Adaptado de Vannier-Santos *et al.* (2002).

1.6 Interação parasito-célula hospedeira

Os macrófagos têm um papel importante na patogenia da leishmaniose, servindo simultaneamente como células hospedeiras e efetores da resposta imunológica. A adesão de promastigotas à superfície do macrófago é pré-requisito para que o parasito ganhe o ambiente intracelular. Logo que entra em contato com o sangue, as formas promastigotas são opsonizadas por fatores do soro que disparam a ativação do sistema complemento e a deposição do componente C3 na superfície do parasito (DOMÍNGUEZ & TORAÑO, 1999). Os parasitos devem escapar da lise mediada pelo sistema complemento até serem fagocitados por macrófagos. A opsonização por C3 induz o fenômeno de adesão imune, onde os parasitos se ligam a eritrócitos via CR1 e CR3, são fagocitados por leucócitos sem que ocorra a explosão respiratória (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2003). A resistência à lise depende, principalmente, de moléculas de superfície do parasito como LPG e gp 63 (BRITTINGHAM *et al.*, 1995; OLIVIER *et al.*, 2005). A opsonização de promastigotas metacíclicos por C3b e C3bi permite a interação com receptores CR1 e CR3, respectivamente, na superfície de macrófagos. Formas metacíclicas de *L. (L.) major* apresentam moléculas de LPG mais extensas do que formas procíclicas, o que auxilia o parasito a escapar da lise pelo sistema complemento, uma vez que o LPG impede o acesso e a inserção do complexo C5-C9 em sua membrana (DESCOTEAUX & TURCO, 1999; PUENTES *et al.*, 1990). A gp 63 também apresenta papel protetor convertendo C3 em C3bi, sem atividade lítica, favorecendo assim, sua opsonização e internalização, o que ocorre da mesma forma em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (BRITTINGHAM *et al.*, 1995). Promastigotas de *L. (L.) donovani* apresentam um mecanismo distinto. Proteínas ligantes de manose (MBP) se ligam ao LPG por sua extremidade oligossacarídica, a qual

possui manose, o que possibilita a formação da C3 convertase e do fragmento C3b, o qual auxilia a adesão do parasito à superfície da célula hospedeira, ativando assim o sistema (CUNNINGHAM, 2001). A inativação do sistema complemento em *L. (L.) major* também pode ser mediada por uma ecto-cinase, LPK-1, que ao fosforilar os componentes da cascata contribui ativamente para sobrevivência intracelular do parasito (HERMOSO *et al.*, 1991). A adesão do parasito também pode ocorrer via receptores para porção Fc de imunoglobulinas (FcR) e proteínas de matriz extracelular, como fibronectina e colágeno (revisto em MOSSER & ROSENTHAL, 1993; MOOSER & BRITTINGHAM, 1997; MARTINY & VANNIER-SANTOS, 2005). Formas amastigotas podem utilizar outros receptores para ganhar acesso à célula hospedeira. *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana* são opsonizadas por imunoglobulinas e são fagocitadas via FcR (DOMÍNGUEZ & TORAÑO, 1999; PETERS *et al.*, 1995).

É importante destacar o papel dos neutrófilos na infecção por *Leishmania*. Logo que os parasitos são inoculados experimentalmente na pele, um processo inflamatório local é iniciado. Uma grande quantidade de neutrófilos é atraída para o sítio da infecção, uma vez que este é o primeiro tipo celular que migra da circulação durante o processo inflamatório. Os parasitos são fagocitados por um mecanismo independente de opsonização e permanecem viáveis por inibirem a “explosão respiratória” (LAUFS *et al.*, 2002). Dessa forma, neutrófilos funcionam como um “esconderijo” seguro para os parasitos nos primeiros dias de infecção, onde os parasitos permanecem vivos, mas sem conseguir se multiplicar. *Leishmania* utilizam neutrófilos como vetores, como “cavalos-de-Tróia” para terem acesso a macrófagos (LASKAY *et al.*, 2003; VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004). Neutrófilos são células de vida curta e logo entram em apoptose expressando fosfatidilserina na face externa de sua membrana plasmática, o que serve de sinal para

fagocitose por macrófagos (FADOK *et al.*, 1992). A fagocitose de neutrófilos apoptóticos não apenas não leva à ativação das funções microbidas de macrófagos (MEAGHER *et al.*, 1992) como também pode inibir estas respostas efectoras e o parasito pode entrar em sua célula hospedeira final de uma forma “silenciosa”. O fosfolipídio fosfatidilserina também participa da sinalização na infecção à célula hospedeira. Amastigotas de *L. (L.) amazonensis* expõem fosfatidilserina, considerado um marcador inicial de apoptose, na face externa de sua membrana plasmática, mimetizando a morte celular programada, o que facilita a fagocitose via receptor para fosfatidilserina (PSR) na superfície da célula hospedeira (BARCINSKI *et al.*, 2003; WANDERLEY *et al.*, 2005).

1.7 Sinalização celular na infecção

A sobrevivência dos parasitos no ambiente fagolisossomal depende diretamente de estratégias de desativação celular, onde vias de sinalização da célula hospedeira são alteradas ou bloqueadas. A infecção de macrófagos por *Leishmania* leva à inibição de suas principais funções como produção de citocinas (SUTTERWALA *et al.*, 1997), produção de metabólitos tóxicos do oxigênio (BUCHMULLER-ROUILLER & MAUEL, 1987; MURRAY & NATHAN, 1999), produção de óxido nítrico (NATHAN & XIE, 1994; PROUDFOOT *et al.*, 1995; 1996), expressão de moléculas MHC classe II em resposta à ativação por IFN- γ (REINER *et al.*, 1987) e expressão do gene *c-fos* em resposta ao LPS ou éster de forbol (DESCOTEAUX & MATLASHEWSKI, 1989; MOORE *et al.*, 1993; VANNIER-SANTOS *et al.*, 2002; MARTINY & VANNIER-SANTOS, 2005).

A ligação de moléculas de superfície do parasito a receptores na superfície do macrófago leva à ativação desses receptores, comumente por fosforilação e/ou mudança conformacional, que resulta na ativação de segundos mensageiros no citossol. Um dos segundos mensageiros que modula a infecção da célula hospedeira pelo parasito é o Ca^{12} . (DOCAMPO & MORENO, 2003). A infecção por *Leishmania* leva a um aumento na $[\text{Ca}^{21}]$ de fagócitos (OLIVIER *et al.*, 1992). O LPG seqüestra Ca^{2+} (EILAM *et al.*, 1985) contribuindo para uma rápida elevação da concentração citoplasmática desse íon na célula hospedeira (MANSFIELD & OLIVIER, 2002). Estudos anteriores demonstraram que o pré-tratamento de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* com quelantes de Ca^{+2} diminuem a invasão da célula hospedeira (LU *et al.*, 1997). Bloqueadores de canais de Ca^{+2} inibem a adesão do parasito ao macrófago (MISRA *et al.*, 1991; RODRIGUEZ *et al.*, 2002). Além

disso, cascatas de sinalização Ca^{12} e/ou fosfoinosítídeos-dependentes encontram-se deficientes em células infectadas (REINER, 1994). Diferentes isoformas de PKC estão envolvidas em diversas funções celulares como indução de mediadores da resposta inflamatória (MORTENSEN & ZHONG, 2000), expressão de MHC I e II (LEE *et al.*, 1995) e indução da “explosão respiratória” (WILSON *et al.*, 1986). Além disso, essas enzimas transmitem sinais da superfície celular ao núcleo pela ativação de vias de sinalização posteriores como MAPK (CLAYTON *et al.*, 1995). Em macrófagos, a transdução de sinais dependente de PKC disparada por LPS é iniciada pela ativação da fosfolipase C (PLC) e hidrólise do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) em inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG; MARTINY & VANNIER-SANTOS, 2005). Como resultado da ativação de PKC ocorre fosforilação de proteínas-alvo e expressão de genes como *c-fos*, cujo produto age como um terceiro mensageiro acoplando sinais iniciados na superfície celular em alterações fenotípicas duradouras, pela expressão de genes específicos (VANNIER-SANTOS *et al.*, 2002). A inibição da translocação de PKC do citossol para membrana é atribuída ao LPG, que reduz a sensibilidade da enzima ao diacilglicerol, seu ativador endógeno. Essa inibição está correlacionada com uma redução na geração de radicais tóxicos de oxigênio pela célula hospedeira (OLIVIER *et al.*, 1992). A inibição de vias ativadas por PKC pode aumentar os níveis de infecção por *Leishmania*. O tratamento de macrófagos com inibidores de PKC, estaurosporina e H7, induziu um aumento na carga parasitária (MOORE *et al.*, 1993). Várias espécies de *Leishmania* e gp 63 purificado inibem MARCKS (substrato de cinase C miristoilado rico em alanina) e proteína associada a MARCKS (MRP), que estão envolvidos na regulação do rearranjo do citoesqueleto de actina, evento importante na fagocitose e tráfego de membrana em macrófagos (OLIVIER *et al.*, 2005). Tanto MARCKS quanto MRP são regulados negativamente em macrófagos

infectados por *L. (L.) major*, pela degradação proteolítica da gp 63 (CORRADIN *et al.*, 1999). Glicosilfosfoinosítídeos (GIPLs) de formas promastigotas inibem a síntese de óxido nítrico, pela inibição da atividade PKC, reduzindo a atividade leishmanicida de macrófagos (PROUDFOOT *et al.*, 1995).

A atividade AcP é capaz de inibir o surto respiratório de neutrófilos (REMALEY *et al.*, 1985), podendo ser importante na sobrevivência dos promastigotas recentemente endocitados.

A atividade tirosina cinase (PTK) também se encontra reduzida em macrófagos infectados por *Leishmania*, o que resulta na inibição da sua ativação por IFN- γ . O IFN- γ é a principal molécula efetora na resposta celular contra a leishmaniose. Seu papel protetor é atribuído à sua habilidade de ativar macrófagos e aumentar sua atividade microbicida pela via JAK-STAT; (BOEHM *et al.*, 1997). Quando se liga ao seu receptor, o IFN- γ ativa as tirosina cinases JAK 1 e JAK 2 (Janus kinase) que fosforilam o fator de transcrição STAT 1 (signal transduction and activators of transcription). Esse é translocado ao núcleo onde se liga a elementos da região promotora de genes responsivos, levando à transcrição e ativação celular. Macrófagos infectados por *L. (L.) donovani* apresentam ativação diminuída de JAK 1 e JAK 2 (NANDAN & REINER, 1995). A cascata MAPK (proteína ativada por mitógenos cinase) também é inibida pela infecção por *Leishmania*. A atividade ecto-fosfatase de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* induz defosforilação de ERK1 (extracellular signal-regulated kinase) MAPK em resposta ao LPS (MARTINY *et al.*, 1999).

1.8 Sinalização celular em tripanossomatídeos

A invasão, diferenciação e sobrevivência no interior da célula hospedeira, bem como a adesão e a diferenciação no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado dependem, essencialmente, de respostas rápidas às modificações no microambiente, como temperatura e pH. Essas respostas são mediadas por vias de sinalização celular e em eucariontes, essas vias envolvem a ação coordenada de proteína cinases e fosfatases, proteínas G e segundos mensageiros. Modificações na atividade dessas moléculas são iniciadas pela ligação de outras moléculas externas, como fatores de crescimento, por mudanças ambientais ou em mecanismos homeostáticos internos. O resultado fisiológico dessas modificações inclui, alterações no citoesqueleto, endocitose, exocitose e expressão gênica (PARSONS & RUBEN, 2000). Proteína cinases e fosfatases são moléculas-chave no controle desses eventos celulares. Elas são responsáveis por fosforilar e defosforilar, respectivamente, outras proteínas, particularmente, em resíduos de serina, treonina ou tirosina (HUNTER, 1995).

Muitas das vias de transdução de sinais presentes em eucariontes superiores já foram descritas em tripanossomatídeos (FLAWIÁ *et al.*, 1997; PARSONS & RUBEN, 2000; NAULA & SEEBECK, 2000), apesar do repertório de moléculas utilizadas por esses parasitos ser muito limitado, assim como os tipos de respostas desencadeadas por elas. Dentre as moléculas descritas por terem efeito fisiológico em tripanossomatídeos estão os fatores de crescimento e as citocinas (HIDE *et al.*, 1989; BARCINSKI *et al.*, 1992; DE CASTRO & LUZ, 1993). IGF (fator de crescimento semelhante à insulina) induz resposta proliferativa em promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) mexicana* (GOMES *et al.*, 1997; GOTO *et al.*, 1998). IFN- γ é descrito como modulador direto da proliferação

(MUSTAFÁ *et al.*, 1997) e da atividade de Kfr1, uma cinase estruturalmente relacionada a MAPKs, também atuante na proliferação em *Trypanosoma brucei* (HUA & WANG, 1997).

O Ca^{2+} é um segundo mensageiro reconhecido por muitas células eucarióticas, onde desempenha papel crucial no controle de diversas funções. Uma vez dentro da célula, o Ca^{2+} pode interagir com proteínas, como a calmodulina e troponina C ou pode ser estocado em organelas citoplasmáticas como retículo endoplasmático (RE) e mitocôndrias. Membros da família Trypanosomatidae possuem maquinaria para produzir e regular sinais de Ca^{2+} (PARSONS & RUBEN, 2000). A homeostasia de Ca^{2+} nestes parasitos é realizada principalmente pelo acidocalciossoma, organela que constitui um potencial alvo quimioterápico, uma vez que não é encontrada em células de mamíferos (DOCAMPO & MORENO, 2003). Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* apresentam atividade PKC e CaMK (proteína cinase dependente de calmodulina; FLAWIÁ *et al.*, 1997). Formas tripomastigotas de *T. cruzi* aumentam sua concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) após adesão à célula hospedeira (DOCAMPO & MORENO, 1996). O Ca^{2+} regula a infectividade em amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (LU *et al.*, 1997). Aumentos na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ podem estar associados à ativação de PKC e a atividade dessa enzima regula a expressão de fosfatase ácida de membrana e secretada em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, promovendo a infecção de macrófagos (VANNIER-SANTOS *et al.*, 1995).

Mudanças no perfil de fosforilação de proteínas durante o ciclo de vida dos parasitos sugerem que essas enzimas tenham um importante papel na virulência, diferenciação e divisão celulares (MUKHOPADHYAY *et al.*, 1988; HERMOSO *et al.*, 1991; COOL & BLUM, 1993; HERMOSO & JAFFE, 1993; MOTTRAM *et al.*, 1993; PARSONS *et al.*, 1993). Diversas proteínas do tipo tirosina cinases e fosfatases (COOL & BLUM, 1993; PARSONS *et al.*, 1993; MARTINY *et al.*, 1996) e cinases ciclina-

dependentes (HASSAN *et al.*, 2001) foram descritas em tripanossomatídeos. Em *Trypanosoma brucei*, modificações na atividade de diversas classes de serina/treonina e tirosina cinases foram detectadas entre os estágios procíclico e sanguíneo e, mesmo nesse último, entre as formas largas e delgadas (TU & WANG, 2004). A fosforilação de proteínas em resíduos de tirosina é dependente do estágio de diferenciação em *T. congolense* (PARSONS *et al.*, 1995) e *L. (L.) major* (DELL & ENGEL, 1994). A atividade de PKA (proteína cinase dependente de AMP_c) uma serina/treonina cinase, está associada à metaciclogênese em *L. (L.) amazonensis*, sendo aproximadamente duas vezes maior em sobrenadante com maior concentração de promastigotas metacíclicos (GENESTRA *et al.*, 2004).

Componentes da cascata MAPK têm sido identificados em tripanossomatídeos. Em *L. (L.) mexicana*, proteína cinases com significativa homologia com MEKKs de eucariotos superiores foram identificadas e caracterizadas, LmxPK4 e LmxMPK9. LmxPK4 não é vital para promastigotas, mas é essencial para o estabelecimento da infecção da célula hospedeira e, provavelmente, está envolvida na diferenciação de promastigotas a amastigotas (KUHNS & WIESE, 2005), enquanto LmxMPK9 é encontrada apenas em formas promastigotas e está envolvida no crescimento do flagelo (WIESE *et al.*, 2003a; BENGIS *et al.*, 2005). Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* induzem fosforilação em resíduos de tirosina nos macrófagos durante a adesão à célula hospedeira (MARTINY *et al.*, 1996), evento este essencial para o estabelecimento da infecção. No entanto, pouco é conhecido sobre proteínas que controlam o ciclo celular e a diferenciação em *Leishmania*.

Centenas de fármacos disponíveis comercialmente têm como alvo alguma molécula ou via de transdução de sinais (NAULA & SEEBECK, 2000). Embora alguns tenham ação antiparasitária, atuam também em vias do hospedeiro. Acredita-se que proteína tirosina

cinases de tripanossomatídeos possam ser distintas das de mamíferos. Provavelmente, a fosforilação em resíduos de tirosina deva estar em grande parte, sendo exercida por cinases de dupla especificidade (BOSHART & MOTTRAM, 1997), o que permitiria o desenho de compostos altamente seletivos que poderiam vir a substituir os fármacos atualmente utilizados no tratamento das leishmanioses, reduzindo assim os efeitos colaterais para o hospedeiro.

1.9 Papel dos inibidores de proteína cinases

Antagonistas específicos de proteína cinases podem ser utilizados para elucidar o papel biológico dessas proteínas e muitos apresentam potencial terapêutico no tratamento do câncer (AGRAWAL *et al.*, 2005; LEVITZKI, 1999, 2005; SPICER & HARPER, 2005; WAKELING, 2005). A utilização desses antagonistas poderia levar ao bloqueio da diferenciação de *Leishmania* para formas mais infectivas ou mesmo inibir sua replicação no hospedeiro vertebrado. Genisteína é um isoflavonóide isolado de *Pseudomonas* sp. conhecido por inibir várias classes de proteína tirosina cinase, inclusive a autofosforilação do receptor para fator de crescimento epidérmico (EGFR). Tal inibição é competitiva em relação ao sítio de ATP e não-competitiva quanto ao aceptor de fosfato, podendo o composto, portanto, se ligar a várias regiões da enzima (AKIYAMA *et al.*, 1986). Seu efeito em proteína serina/treonina cinases como PKA e PKC é desprezível (OKAJIMA *et al.*, 1994; PETERSON, 1995). Enzimas não relacionadas a vias de sinalização também podem ser afetadas por genisteína, como DNA topoisomerasas I e II e β -galactosidasas (AKIYAMA & OGAWARA, 1991). As tirfostinas são compostos químicos estruturalmente análogos à cadeia lateral do aminoácido tirosina (YASHI *et al.*, 1988;

LEVITZKI, 2005) que foram originalmente desenvolvidos como inibidores competitivos do EFGR, sintetizados a partir dos compostos erbstatina ou lavendustina A. São inibidores com diferentes modos de ação podendo ser competitivos em relação ao substrato e/ou ATP, podendo também ter ação sobre DNA topoisomerasas I e II (LEVITZKI, 1992, 1999). Tirfostina 25 inibe especialmente EGFR e induz apoptose em células leucêmicas humanas (BERGAMASCHI *et al.*, 1993). Esses compostos são descritos como agentes antiproliferativos, uma vez que são inibidores específicos de PTKs e a atividade aumentada dessas proteínas está diretamente associada a doenças proliferativas como câncer (BISHOP, 1987; SHIR *et al.*, 2003), aterosclerose (ROSS, 1989; LEVITZKI & GAZIT, 1995) e psoríase (BEN-BASSAT, 2001; VASSAR & FUCHS, 1991). A estaurosporina foi descoberta por Omura e colaboradores em 1977, enquanto realizavam uma triagem de alcalóides de origem microbiana. O composto foi isolado de *Streptomyces* sp. e é um potente inibidor de PKC, PKA e PTKs. Estaurosporina age inibindo a atividade do domínio catalítico de PKC e PKA. Quanto à inibição de PTKs, sabe-se apenas que não ocorre via sítio de ligação do ATP (TAMAOKI & NAKANO, 1990; GESCHER, 1998).

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a fosforilação de proteínas em *Leishmania (L.) amazonensis*, através do uso de diferentes antagonistas de proteína cinases.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Testar o efeito de inibidores de proteína cinases na proliferação *in vitro* de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*;
2. Avaliar o efeito do tratamento com os antagonistas de proteína cinases sobre os parasitos em relação ao conteúdo protéico, à fosforilação de proteínas em resíduos de tirosina e serina, à organização ultraestrutural e à atividade ecto-fosfatásica;
3. Determinar o efeito dos antagonistas de proteína cinases sobre a infectividade de promastigotas.

3. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose é uma doença que acomete milhares de pessoas em praticamente todos os países, especialmente observada em áreas tropicais e subtropicais (DESJEUX, 1992; 2004). Os medicamentos utilizados para o tratamento da leishmaniose apresentam metais altamente tóxicos (antimoniais pentavalentes) para o hospedeiro, o que leva à busca por novas drogas com menos efeitos colaterais.

Nos últimos anos, uma série de publicações mostrou a importância de cascatas de sinalização celular em processos de infecção por patógenos, especialmente bactérias (COSSART & SANSONETTI, 2004). Proteína cinases, especialmente PTKs, controlam diversos eventos desde fagocitose (KWIATKOWSKA & SOBOTA, 1999) até mecanismos microbicidas (LU *et al.*, 1993) e eventos de fosforilação de proteínas estão associados à proliferação celular. Vários trabalhos demonstraram a participação de PKs de macrófagos na infecção e sobrevivência de *Leishmania*, mas poucos abordam as vias de sinalização presentes no parasito (VANNIER-SANTOS *et al.*, 1995). Compostos com ação seletiva contra cascatas de sinalização celular podem ser utilizados para dissecar as vias presentes nestes protozoários, uma vez que falhas na transdução de sinais ou a indução de sinais inadequados pode comprometer a sobrevivência desses parasitos em seus hospedeiros (PARSONS & RUBEN, 2000), além de permitir a compreensão de fenômenos básicos da biologia celular desses protozoários.

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*: A cepa de escolha foi MHOM/Br/75/Josefa de *L. (L.) amazonensis*, isolada pelo Dr. C. A. Cuba-Cuba (Universidade de Brasília), de um caso de leishmaniose cutânea difusa. Os parasitos foram mantidos axenicamente em meio Warren modificado (infusão de cérebro e coração bovino, ácido fólico e hemina), suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 26°C.

4.2 Medidas de proliferação celular: Foram utilizados inóculos de 5×10^4 parasitos / mL. Os parasitos foram centrifugados e lavados duas vezes em salina tamponada com fosfato (PBS) estéril. Após a última lavagem, o sobrenadante foi desprezado, as células foram ressuspensas em 1 mL do mesmo tampão e contadas em câmara de Neubauer. Os parasitos foram incubados, a 26°C, em presença ou ausência de inibidores de diferentes classes de proteína cinases e o crescimento verificado a cada 24 horas. Os dados apresentados são representativos de quatro experimentos independentes, todos realizados em duplicata.

4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida: Os parasitos foram tratados com os inibidores por 3, 24 e 48 horas e as células foram ressuspensas em tampão de lise (Tris 100 mM; NaCl 150 mM; glicerol 10 % e triton, 0,6 %). A concentração de proteína das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976), ajustada para 3 mg / mL e separadas em gel de poliacrilamida 7,5 %, a 120V fixos, por uma hora. O gel foi então corado em solução de azul de Coomassie ou utilizado imediatamente para transferência. O experimento apresentado é representativo de dois experimentos em duplicata, cujo padrão de expressão de proteínas foi semelhante. A análise densitométrica das bandas foi feita utilizando o programa Scion Image.

4.4 Western blotting: Após corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (TOWNBIN *et al.*, 1979). A membrana foi bloqueada em tampão Tris-salina (TBS) suplementado com 3 % albumina sérica bovina e Tween 20 0,01 %, incubada com anticorpo monoclonal anti-fosfotirosina clone 4G10 (Upstate Biotechnology Inc.) ou anticorpo monoclonal anti-fosfoserina clone PSR-45 (Sigma Chemical Co.) e em seguida com anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase de rabanete (HRP; Gibco). O experimento é representativo de dois experimentos independentes. A análise densitométrica das bandas foi feita utilizando o programa Scion Image.

4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão: Parasitos pré-tratados com os antagonistas foram lavados e fixados em glutaraldeído 2,5 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 durante 1 hora, à temperatura ambiente. Após fixação, as amostras foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1 % em tampão cacodilato 0,1 M, ferrocianeto de potássio 0,8 % e cloreto de cálcio 5 mM, ao abrigo da luz. A seguir os parasitos foram lavados, desidratados em concentrações crescentes de acetona (70-100 %), com duração de 10 min. cada, infiltrados e incluídos em resina epoxi Polybed (Polysciences). Cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrótomo e coletados em grades de cobre de 400 “mesh”. A contrastação foi realizada utilizando acetato de uranila e citrato de chumbo e os cortes foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109.

4.6 Microscopia eletrônica de varredura: Parasitos pré-tratados com os inibidores foram lavados e fixados como descrito acima. Após fixação, as amostras foram lavadas no mesmo tampão e as células aderidas sobre lamínulas pré-cobertas com solução de poli-*L*-lisina por 1 h. As amostras foram pós-fixadas como acima descrito. As amostras foram lavadas duas vezes com o mesmo tampão e submetidas à desidratação em séries crescentes de acetona (50-100 %), com duração de 10 min. cada. Após desidratação as amostras foram submetidas à secagem pelo método do ponto crítico. As lamínulas foram montadas em suportes metálicos e estes submetidos a uma atmosfera de argônio de 0,1 mBAR para metalização. As amostras foram observadas em microscópio de varredura JEOL JSM5310.

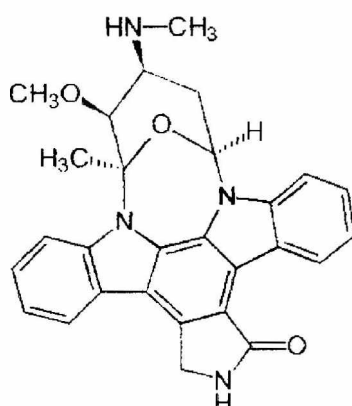
4.7 Dosagem da atividade fosfatase ácida: A atividade fosfatásica foi dosada utilizando 10^7 promastigotas/mL intactos tratados ou não em uma mistura de reação contendo tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0, $MgCl_2$ 5 mM e *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) 10 mM. A concentração de parasitos utilizada é suficiente para catalizar a hidrólise do *p*-NPP de forma linear durante 60 min a 35 °C. A reação foi iniciada pela adição dos parasitos vivos e finalizada após 60 min pela adição de NaOH 1N. A hidrólise foi determinada pela detecção espectrofotométrica de *p*-nitrofenol a 425 nm, utilizando um coeficiente de extinção de $14,3 \times 10^{-3} M^{-1} cm^{-1}$. Para a obtenção da atividade secretada, o mesmo inóculo de parasitos foi incubado em meio de reação em ausência do substrato, por 60 min., centrifugados e o *p*-NPP adicionado ao sobrenadante resultante. A reação foi parada após 60 min. pela adição de NaOH 1 N. A atividade de membrana foi obtida pela subtração da atividade total pela atividade secretada. Os dados apresentados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como médias e desvios padrões. Diferenças foram consideradas estatisticamente significante se $P < 0,05$, como determinado pelo teste ANOVA.

4.8 Citoquímica para detecção de fosfatase ácida: Os parasitos foram pré-tratados com diferentes concentrações dos inibidores, por 1h e 24h, lavados duas vezes em PBS e pré-fixados em glutaraldeído 1 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 por 10 min. a 4 °C. Foram então lavados duas vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e uma vez em tampão Tris-maleato pH 5,0. Logo após, os parasitos foram incubados em meio de reação contendo cloreto de cério 1 mM, *p*-NPP 1 mM, sacarose 5 % (p/v) em tampão Tris-maleato 0,1 mM pH 5,0, por 45 min. a 37 °C. As células foram então lavadas no mesmo tampão acrescido de sacarose 5 % e duas vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 6,0. Os parasitos foram fixados em glutaraldeído 2,5 % em cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 acrescido de sacarose 5 % e processados para microscopia eletrônica de transmissão.

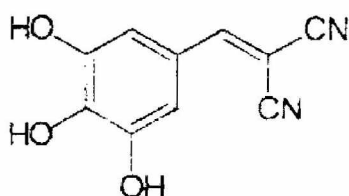
4.9 Cultivo primário de macrófagos: macrófagos foram obtidos por lavagem peritoneal de camundongos BALB/c em meio DMEM e plaqueados sobre lamínulas redondas de vidro (13 mm de diâmetro) em placas de cultura de 24 poços. As células foram mantidas por 60 min. a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂ para adesão, os macrófagos não aderidos foram removidos por lavagem com PBS. Novo meio DMEM suplementado com 10 % SFB foi adicionado à monocamada que permaneceu incubada por 12h nas mesmas condições de temperatura e atmosfera.

4.10 Ensaio de interação e sobrevivência: Os parasitos foram pré-tratados com diferentes concentrações dos inibidores por 1 hora, lavados duas vezes em PBS estéril, contados e adicionados à monocamada de macrófagos peritoneais na proporção de 10: 1 (parasitos-macrófago). Após 1 hora de interação, a 37 °C, o meio foi retirado, as lamínulas lavadas com PBS estéril e fixadas com álcool absoluto. As lamínulas foram desidratadas em álcool absoluto, coradas com hematoxilina e eosina e montadas em lâminas para observação e contagem por microscopia óptica sob objetiva de 100 X. Os ensaios de sobrevivência foram realizados com parasitos e macrófagos na mesma proporção, no tempo de 72 horas, à temperatura de 35 °C e atmosfera de 5 % de CO₂. O percentual de macrófagos infectados foi determinado por contagem em microscópio óptico de campo claro. O índice de associação (I.A.) foi determinado segundo Bianco *et al.* 1975, onde I.A.= % macrófagos infectados x média do número de parasitos/macrófago. Os dados apresentados são representativos de três experimentos independentes, realizados em triplicata nos quais foram contados 500 macrófagos por lamínula. Os resultados foram expressos como médias e desvios padrões. Diferenças foram consideradas estatisticamente significante se $P < 0,05$, como determinado pelo teste ANOVA.

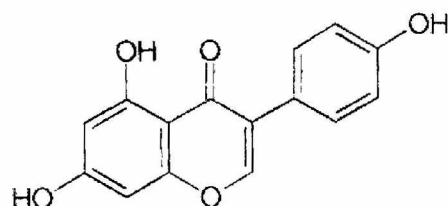
4.11 Inibidores: Estaurosporina (de *Streptomyces* sp.), tirfostina 25 (4,5-Trihidroxibenzilideno-malononitril) e genisteína (4',5,7-trihidroxi-isoflavona) foram obtidos da Sigma Chemical Co. As soluções estoque foram feitas em DMSO, aliquotadas e congeladas até o uso. Nas concentrações utilizadas, o DMSO não causou nenhum efeito na proliferação dos parasitos.



A. Estaurosporina



B. Tirfostina 25



C. Genisteína

Figura 3: Estrutura química dos inibidores de proteína cinases utilizados.

4.12 Análise estatística: Os dados apresentados neste trabalho são representativos de, pelo menos, três experimentos independentes. Para a análise dos dados foi teste estatístico de escolha foi a análise de variância (ANOVA), utilizado o programa GraphPad Prism 4.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito de inibidores de proteína cinases na proliferação dos parasitos

Para verificar o efeito dos inibidores de proteína cinases na proliferação *in vitro* dos parasitos, promastigotas de *L. amazonensis* (5×10^4) foram incubados com concentrações crescentes dos diferentes inibidores, em meio de cultivo, por 7 dias e o número de parasitos foi determinado, a cada 24 horas, em câmara de Neubauer. Em presença dos antagonistas estaurosporina (fig. 4), genisteína (fig 5) e tirfostina 25 (fig 6) a proliferação *in vitro* dos parasitos foi inibida de modo dose-dependente.

5.2 Efeito dos antagonistas na expressão de proteínas

Com o objetivo de verificar se o tratamento dos parasitos com os antagonistas alterou a expressão de proteínas, promastigotas foram coletados após diferentes períodos de exposição às drogas, lisados e submetidos à separação em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. Parasitos expostos à estaurosporina apresentaram inibição na expressão de 3 proteínas com pesos moleculares aproximados de 75, 55 e 43,8 kDa. Essa inibição foi mais significativa sobre a proteína de 43,8 kDa, que após 10 min. apresentou inibição de 60 % e após 30 min. 48,5%. Parasitos expostos à tirfostina 25 e genisteína, por 30 min., também apresentaram inibição na expressão de proteína com peso molecular próximo a 55 kDa, sendo de 30,8 % e 45,2 %, respectivamente. O tratamento dos parasitos com esses antagonistas por 10 min. inibiu de forma pouco significativa, em média 20 % (Fig 7). O percentual de inibição das bandas foi determinado segundo análise feita pelo programa Scion Image.

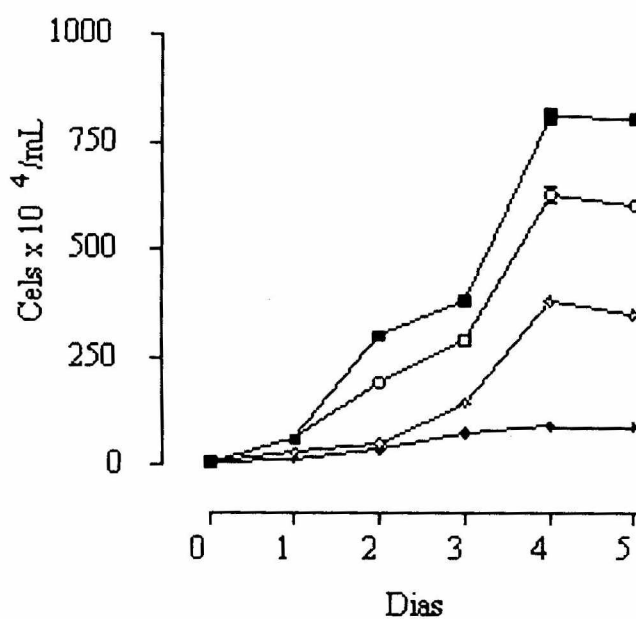


Figura 4: Efeito dose-dependente do inibidor estaurosporina na proliferação de promastigotas. Parasitos foram tratados por 7 dias em meio de cultivo Warren e contados diariamente em câmara de Neubauer. ■- controle; ○- 0,1 μ M; ◇- 0,5 μ M e ◆- 1 μ M. IC_{50} 0,29 μ M. Quatro experimentos independentes, todos realizados em duplicata.

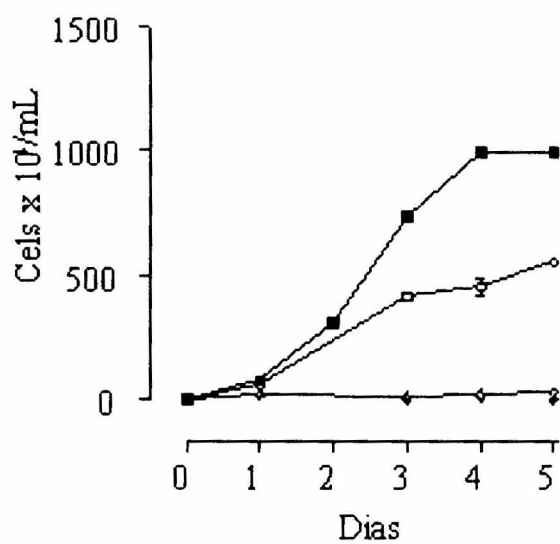


Figura 5: Efeito dose-dependente do inibidor genisteína na proliferação de promastigotas. Parasitos foram tratados por 7 dias em meio de cultivo Warren e contados diariamente em câmara de Neubauer. ■- controle; ○- 10 µM; ◇- 50 µM e ◆- 100 µM. IC₅₀ 11,02 µM. Quatro experimentos independentes, todos realizados em duplicata.

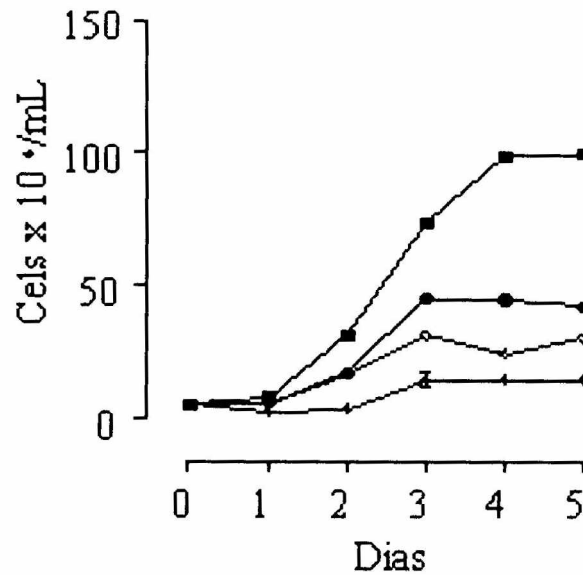


Figura 6: Efeito dose-dependente do inibidor tirfostina 25 na proliferação de promastigotas. Parasitos foram tratados por 7 dias em meio de cultivo Warren e contados diariamente em câmara de Neubauer. ■- controle; ●- 10 µM; ◇- 50 µM e ◆- 150 µM. IC₅₀ 5,89 µM. Quatro experimentos independentes, todos realizados em duplicata.

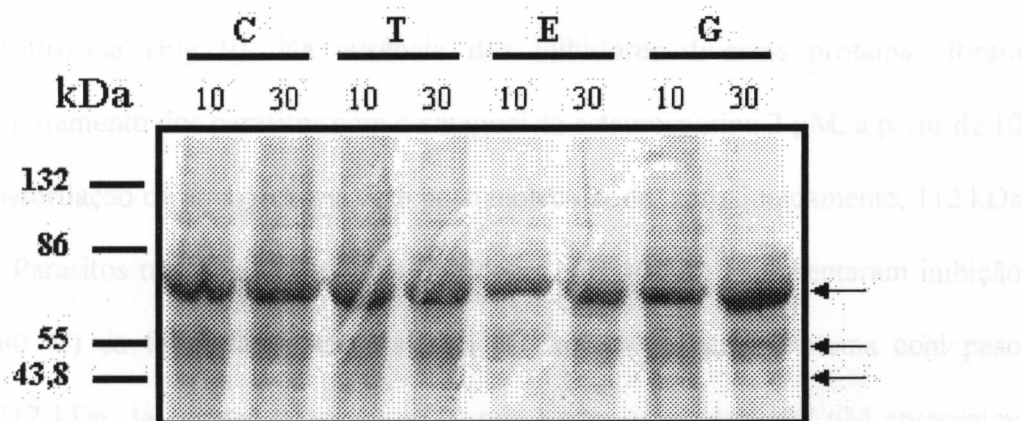


Figura 7: Efeito do tratamento com inibidores de proteína cinases no conteúdo protéico de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Os parasitos controle (C) ou tratados por 10 ou 30 minutos com tirfostina 25 150 μM (T), estaurosporina 2 μM (E) ou genisteína 100 μM (G) foram lisados e submetidos a SDS-PAGE. Notar alterações em proteínas com peso molecular de 75, 55 e 43,8 kDa após tratamento os três inibidores, principalmente com estaurosporina 10 min. (setas).

5.3 Efeito dos inibidores de proteína cinases na fosforilação de proteínas

A fosforilação de proteínas em resíduos de serina e tirosina em promastigotas tratados com os antagonistas de proteína cinases foi analisada. Após a separação eletroforética das proteínas, estas foram reveladas por Western blotting utilizando anticorpo antifosfoserina (Fig 8) ou antifosfotirosina (Fig 9). Na ausência dos inibidores diversas proteínas foram fosforiladas. O tratamento dos parasitos com o antagonista estaurosporina 2 μM , a partir de 10 min., inibe a fosforilação de uma proteína com peso molecular de, aproximadamente, 112 kDa (63 %, Fig 8). Parasitos tratados com os três inibidores, por 10 min., apresentaram inibição significativa (80 %) da fosforilação em resíduos de tirosina em uma proteína com peso molecular de 212 kDa. Já o curto tratamento (10 min.) com genisteína 100 μM apresentou inibição significativa (50 %) da fosforilação em várias proteínas, efeito que é revertido após 30 min. (Fig 9).

5.4 Avaliação ultraestrutural de parasitos tratados com os antagonistas

Com o objetivo de avaliar possíveis alterações ultraestruturais induzidas pelo bloqueio de vias de sinalização no parasito, promastigotas foram incubados com estaurosporina 2 μM , tirfostina 25 150 μM e genisteína 100 μM , por 24 horas e as amostras processadas para microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Parasitos não tratados, crescidos nas mesmas condições, apresentaram ultraestrutura normal, com suas organelas íntegras (Fig. 10). O tratamento com tirfostina 25 150 μM induziu alteração no padrão de compactação do kDNA (Fig 11 A e B), desorganização da mitocôndria única (Fig 11 C) e cisternas de retículo endoplasmático englobando regiões extensas do citoplasma (Fig. 11 D). Tais alterações são

compatíveis com processos autofágicos. O tratamento com 100 μM de genisteína, também induziu alterações semelhantes no kDNA e mitocôndria e figuras sugestivas de autofagia. Foi observado ainda grande número de parasitos com alterações na septação (Fig 12 A) e múltiplos perfis de corpúsculos basais (Fig 12 B) e número alterado de flagelos (Fig.12 C e D). Em muitos parasitos a região de junção desmossomal entre a membrana do flagelo e da saída da BF encontrava-se extremamente hipertrofiada e com as membranas justapostas (Fig. 12 D). Todos os inibidores induziram alterações na BF dos parasitos após 24 horas. O tratamento com estaurosporina 2 μM induziu aumento significativo no volume da bolsa flagelar com acúmulo de vesículas e perfis concêntricos de membrana (Fig. 13 A). Essa dilatação também foi observada na maioria dos parasitos, por microscopia óptica (dados não mostrados). Embora tal aumento no volume da BF não tenha sido observado após o tratamento com tirfostina 25 e genisteína, esta apresentou-se repleta de vesículas (Fig.13 B) e/ou corpos multivesiculares (Fig. 13 C).

Os parasitos tratados com genisteína também foram analisados por microscopia eletrônica de varredura, onde foram observadas “blebs” de membrana, particularmente na abertura da BF e alterações na morfologia flagelar (Fig. 14 B e C).

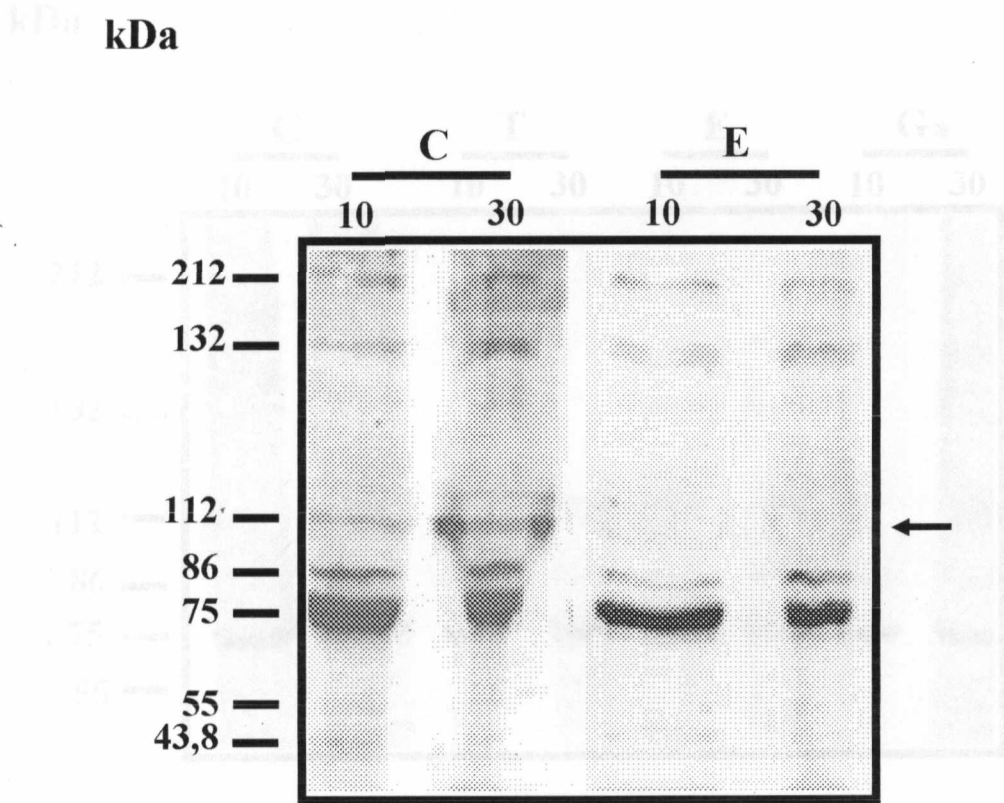


Figura 8: Western blotting de proteínas fosforiladas em resíduos de serina em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, após tratamentos de 10 e 30 min. com estaurosporina (E) 2 μ M. O tratamento induziu diminuição da fosforilação em uma proteína de peso molecular de 112 kDa (seta).

kDa

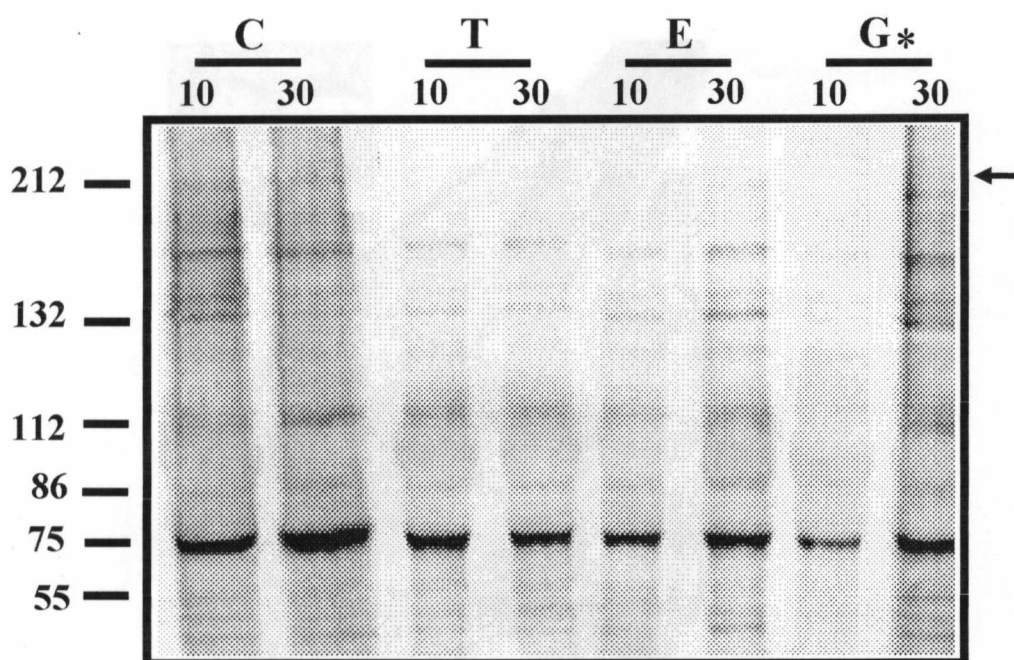


Figura 9: “Western Blotting” de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratados ou não (C) com tirfostina 25 (T) 150 μ M, estaurosporina (E) 2 μ M ou genisteína (G) 100 μ M. Notar diminuição da fosforilação, após 10 min. de tratamento com os três inibidores em proteínas com 212 kDa (seta) e após 10 min. de tratamento em várias proteínas com genisteína (*).

trastorno. Mitocondria (M), bolsa flagelar (BF) ambas representam 0,5 μ m.

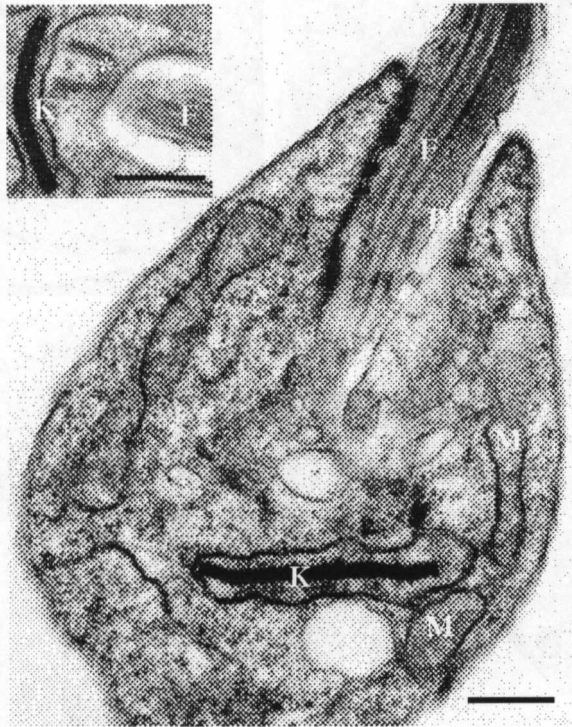


Figura 10: Micrografia de parasito controle apresentando ultraestrutura normal da forma promastigota de *L. (L.) amazonensis*. Em detalhe, cinetoplasto (K), flagelo (F) e corpúsculo basal (*). Mitocôndria (M), bolsa flagelar (BF). Barras representam 0,5 μ m.

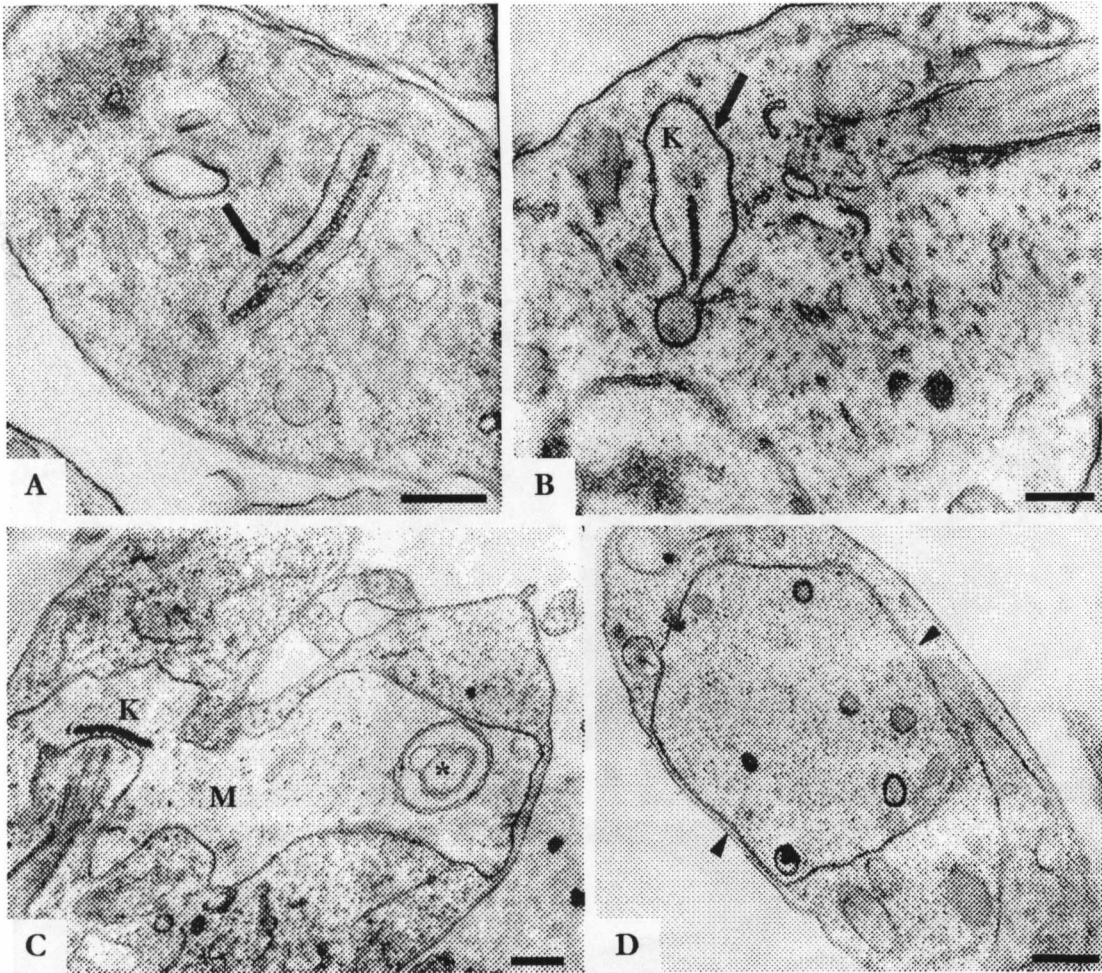


Figura 11: Alterações ultraestruturais de parasitos tratados com tirfostina 25 150 μM por 24 horas. O tratamento induziu desorganização do cinetoplasto (A e B, setas), destruição da mitocôndria (M), a qual apresentou perfis concêntricos de membrana (C, *) e extensa porção do citoplasma envolta por retículo endoplasmático (D, ponta de seta). Barras representam 0,5 μm .

Figura 12: Alterações ultraestruturais em parasitos de *L. (L.) amazonensis* induzidas por 24 horas de tratamento com gentamicina 100 μM . Parasitos apresentaram vários perfis de estruturas basais (B), flagelos (F), (D) indicando tentativas de divisão celular (A-D). Também foi observada porção de rede de sarcoplasma de flagelo com o corpo celular (D, seta). K, cinetoplasto; M, mitocôndria. F, flagelo; seta, D, corpo

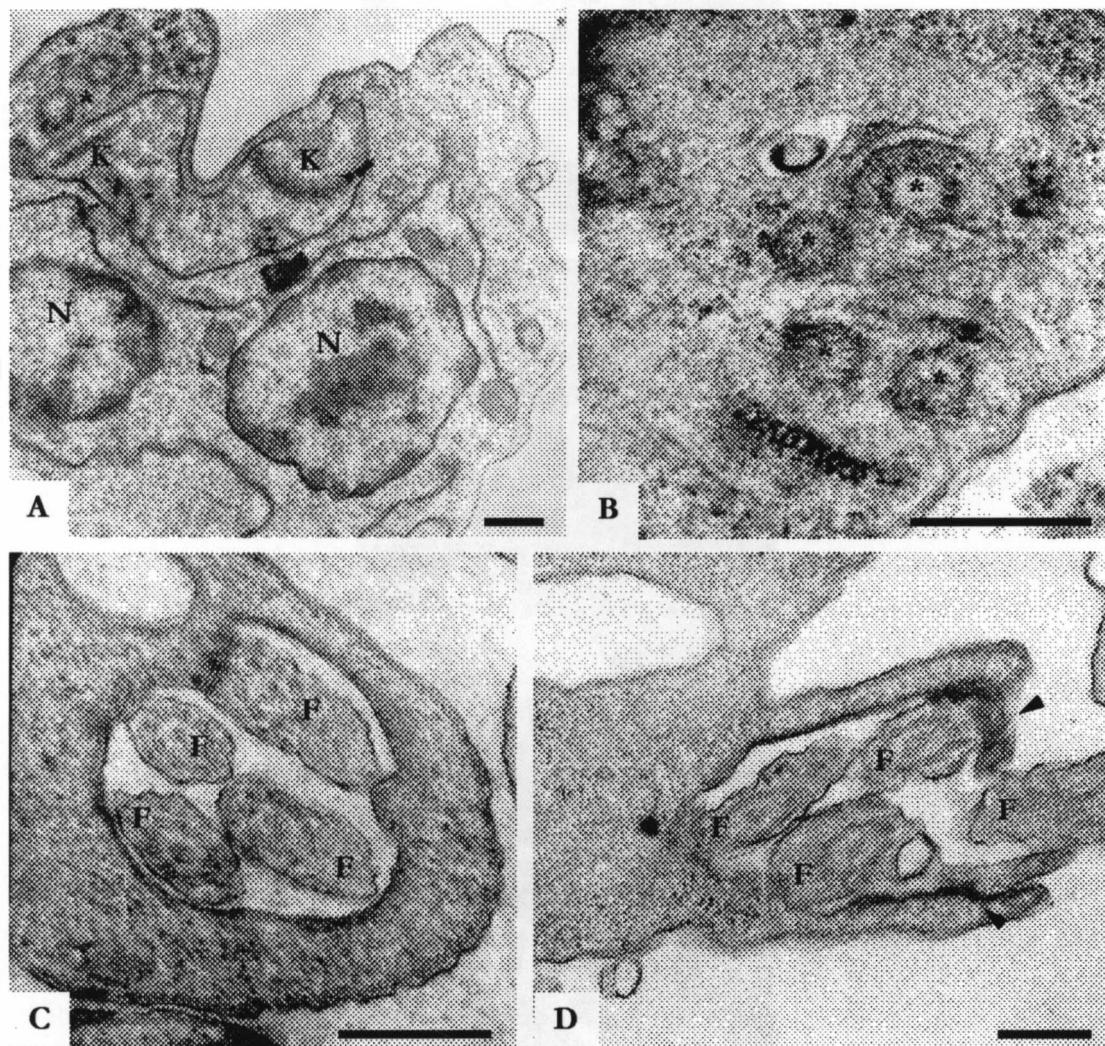


Figura 12: Alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* induzidas por 24 horas de tratamento com genisteína 100 μ M. Parasitos apresentaram vários perfis de corpúsculos basais (B*) de flagelos (F-C, D) indicando tentativas de divisão celular (A-D). Também foi observada extensão da região de junção do flagelo com o corpo celular (D, seta). K, cinetoplasto; N, núcleo. Barras representam 0,5 μ m.

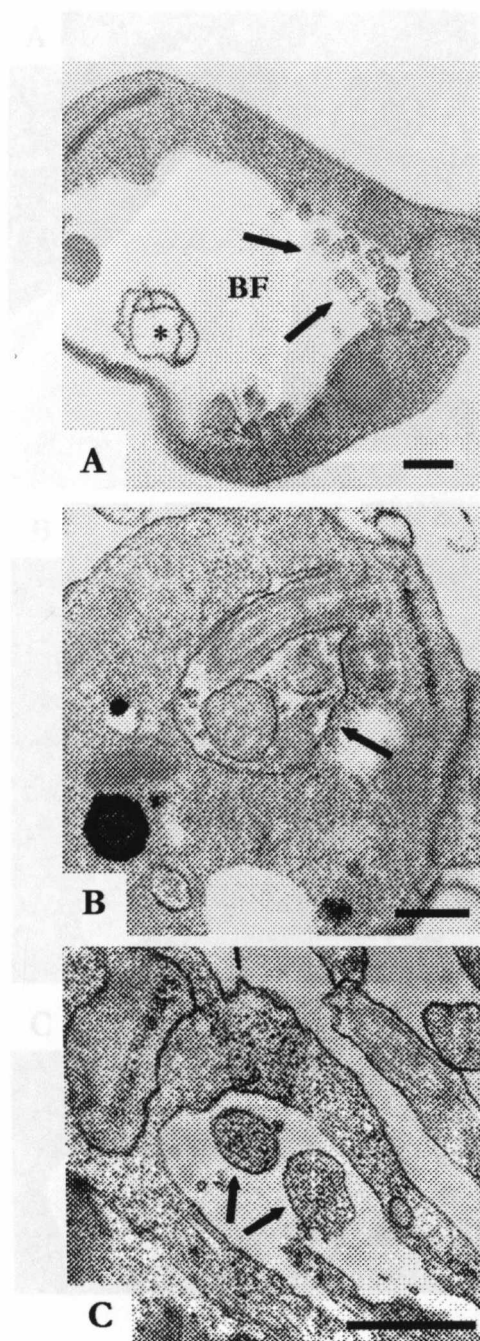


Figura 13: Alterações ultraestruturais na bolsa flagelar de parasitos induzidas por 24 horas de tratamento com estaurosporina 2 μ M (A), tirfostina 25 150 μ M (B) e genisteína 100 μ M (C). Estaurosporina induziu grande dilatação e os três compostos levaram ao acúmulo de vesículas (setas) no lúmen da BF, além da presença de perfis concêntricos de membrana (*). Barras representam 0,5 μ m.

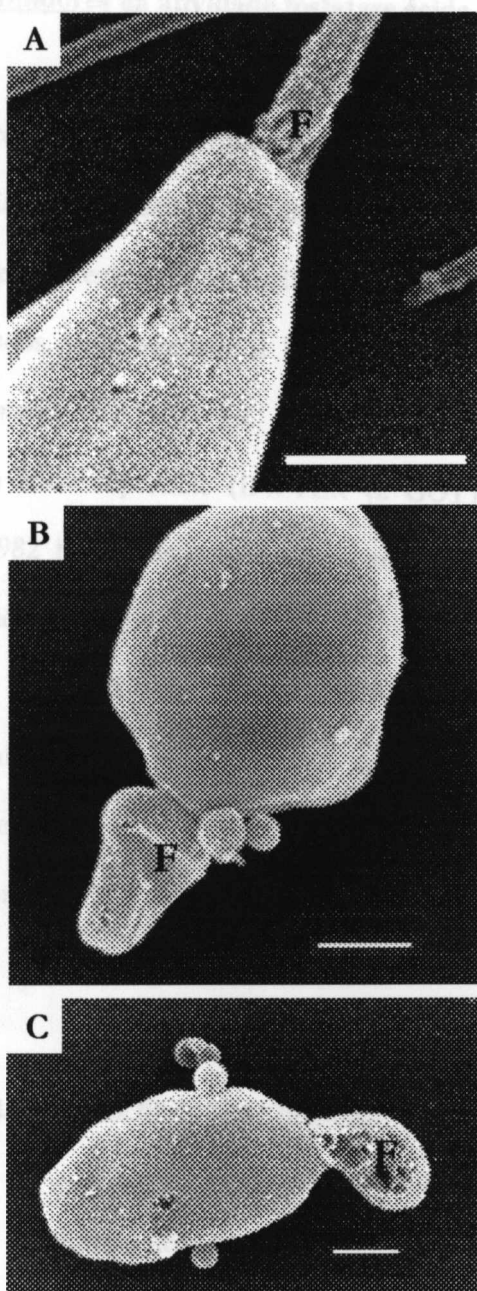


Figura 14: Alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* induzidas pelo tratamento com genisteína 100 μM por 24 horas (B e C) observadas por microscopia eletrônica de varredura. Em A, parasitos controle. Notar alteração na morfologia flagelar. F, flagelo. Barras representam 0,5 μm .

5.5 Efeito dos inibidores na atividade fosfatase ácida

O aumento no volume da BF em parasitos tratados com estaurosporina e o excesso de vesículas nessa região em parasitos tratados com tirfostina 25 e genisteína levou-nos a questionar se o endereçamento e a secreção de enzimas do parasito eram alterados pelos tratamentos empregados, uma vez que a bolsa flagelar é o único sítio de endocitose e exocitose em *Leishmania* (LANDFEAR & IGNATUSHCHENKO, 2001). As fosfatases ácidas de membrana e de superfície (DWYER & GOTTLIEB, 1983 b; GOTTLIEB & DWYER, 1981 a; 1982 b) são as ecto-enzimas majoritárias de formas promastigotas. A determinação colorimétrica da hidrólise de *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) a pH 5,0 demonstrou que estaurosporina 1 μ M, tirfostina 25 150 μ M e genisteína 100 μ M inibem de forma significativa a atividade fosfatase ácida secretada após 24h de tratamento (Fig. 16 B) e que estaurosporina 1 μ M e tirfostina 25 150 μ M também induzem inibição significativa quando são adicionadas no momento da dosagem (Fig. 15 B).

5.6 Localização da atividade da enzima fosfatase ácida em parasitos tratados

Com o objetivo de localizar a atividade da enzima fosfatase ácida, promastigotas de *L. amazonensis* foram tratados com os inibidores por 24 horas e as amostras processadas, através da técnica de citoquímica. Nossa hipótese inicial era que esta enzima estava sendo retida na BF, uma vez que sua atividade secretada foi inibida após o tratamento dos parasitos. Surpreendentemente, o produto da reação não foi encontrado acumulado nesta região e sim no retículo endoplasmático, logo abaixo da membrana plasmática. Além disso, foram encontradas diversas vesículas ao redor do aparelho de Golgi (Fig. 17 C-F).

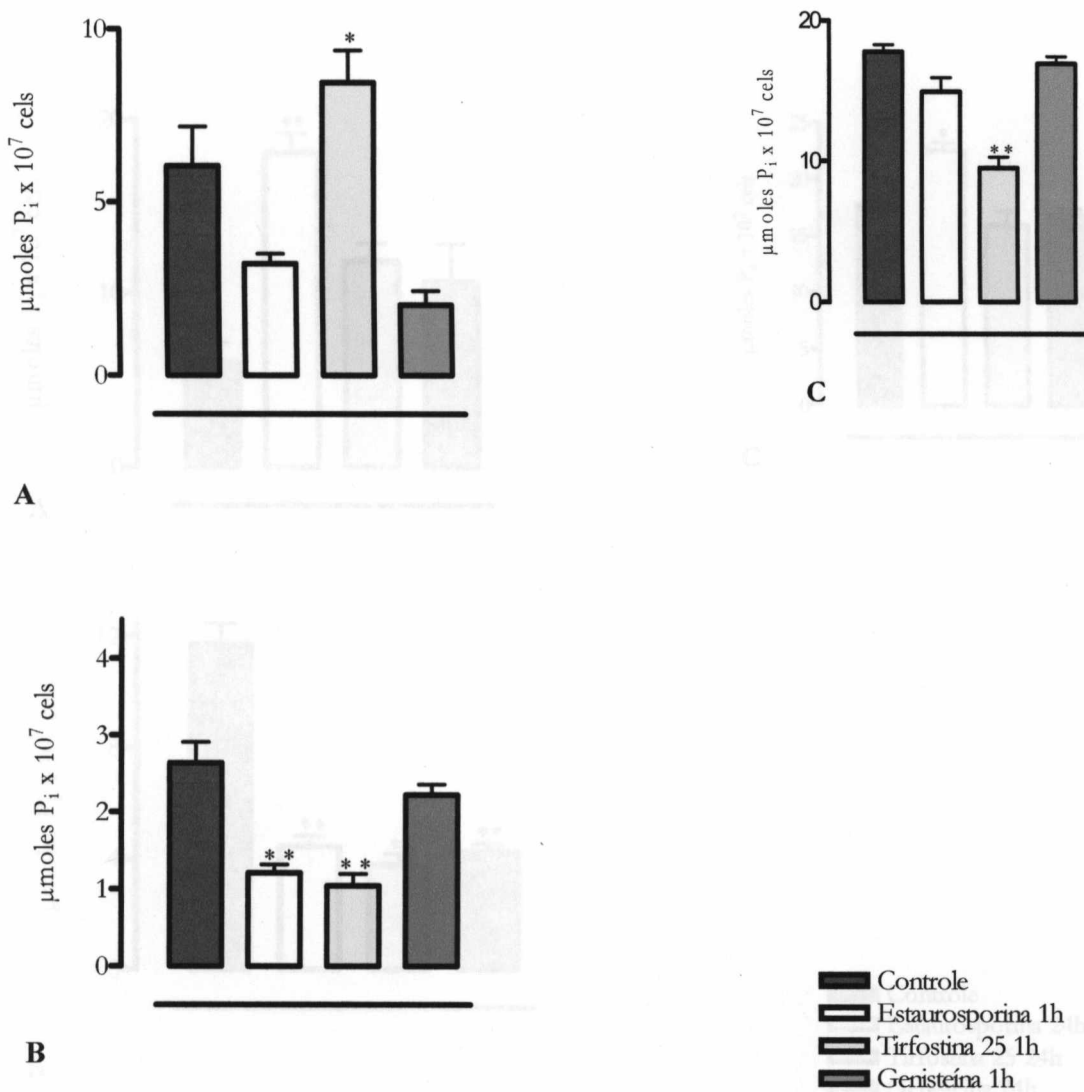


Figura 15: Dosagem da atividade fosfatase ácida em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratados com inibidores de proteína cinases por 1 hora. **A**, atividade de membrana (obtida pela subtração da atividade total pela aquela sensível ao tartarato de sódio); **B**, atividade secretada; **C**, atividade total. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

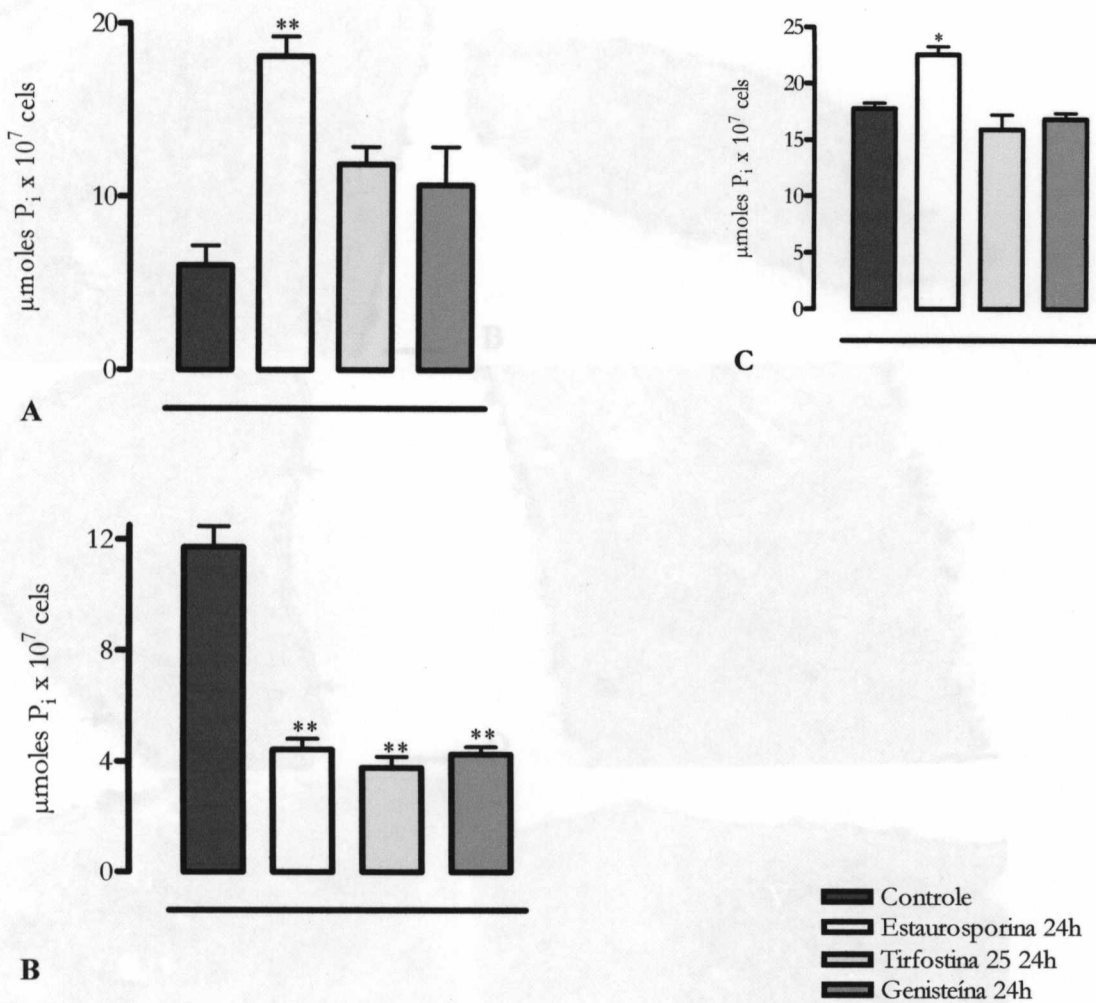


Figura 16: Dosagem da atividade fosfatase ácida em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratados com inibidores de proteína cinases por 24 horas. **A**, atividade de membrana (obtida pela subtração da atividade total pela aquela sensível ao tartarato de sódio); **B**, atividade secretada; **C**, atividade total. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

figura 17. Detecção citoquímica da atividade fosfatase ácida. Os parasitos foram tratados com diferentes inibidores de proteína cinases por 24 horas. A e B, controle; C e D, genisteína 100 μ M; E, estaurosporina 25 μ M. Intenso produto de reação pôde ser observado na superfície celular e no retículo citoplasmático (setas), mas raramente no aparelho de Golgi (G). F, flagelo; V, vesículas. Barras representam 0,5 μ m.

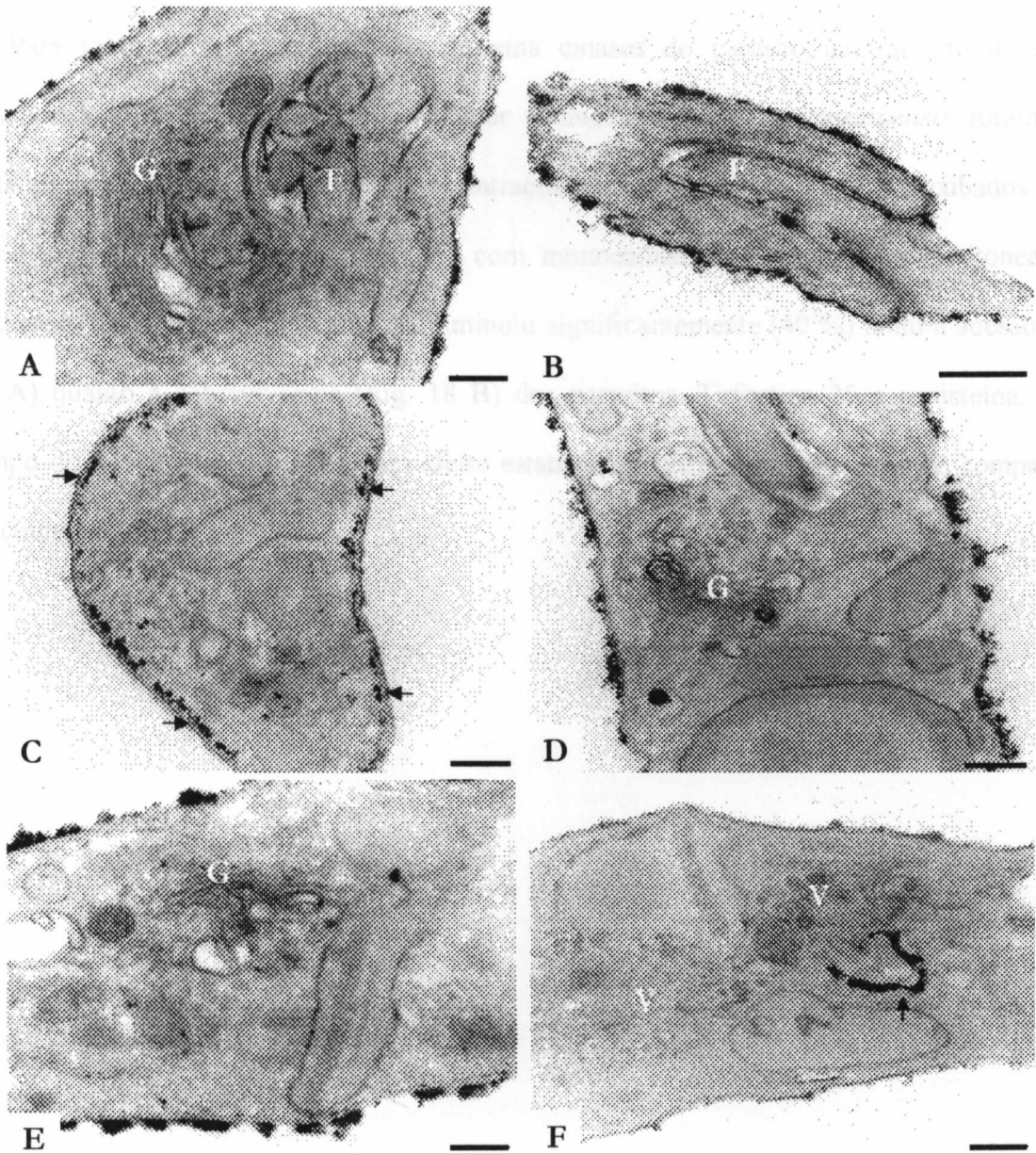


Figura 17: Detecção citoquímica da atividade fosfatase ácida. Os parasitos foram tratados com diferentes inibidores de proteína cinases por 24 horas. A e B, controle; C e D, genisteína 100 μM ; E e F, tirfostina 25 150 μM . Intenso produto de reação pôde ser observado na superfície celular e no retículo endoplasmático (setas), mas raramente no aparelho de Golgi (G). F, flagelo; V, vesículas. Barras representam 0,5 μm .

5.7 Efeito dos antagonistas de proteína cinases na infecção da célula hospedeira

Para verificar a participação de proteína cinases do parasito na infecção da célula hospedeira e na sobrevivência intracelular promastigotas de *L. amazonensis* foram pré-tratados por 1 hora com diferentes concentrações dos inibidores, a 27 °C e incubados por 1 hora, a 37 °C, ou 72 horas, a 35 °C, com monocamadas de macrófagos peritoneais. O tratamento com estaurosporina 1 µM diminuiu significativamente (40 %) tanto a adesão (Fig. 18 A) quanto a sobrevivência (Fig. 18 B) dos parasitos. Tirfostina 25 e genisteína, nesse tempo de tratamento, não induziram efeito estatisticamente significativo quando comparados ao controle (Fig.18).

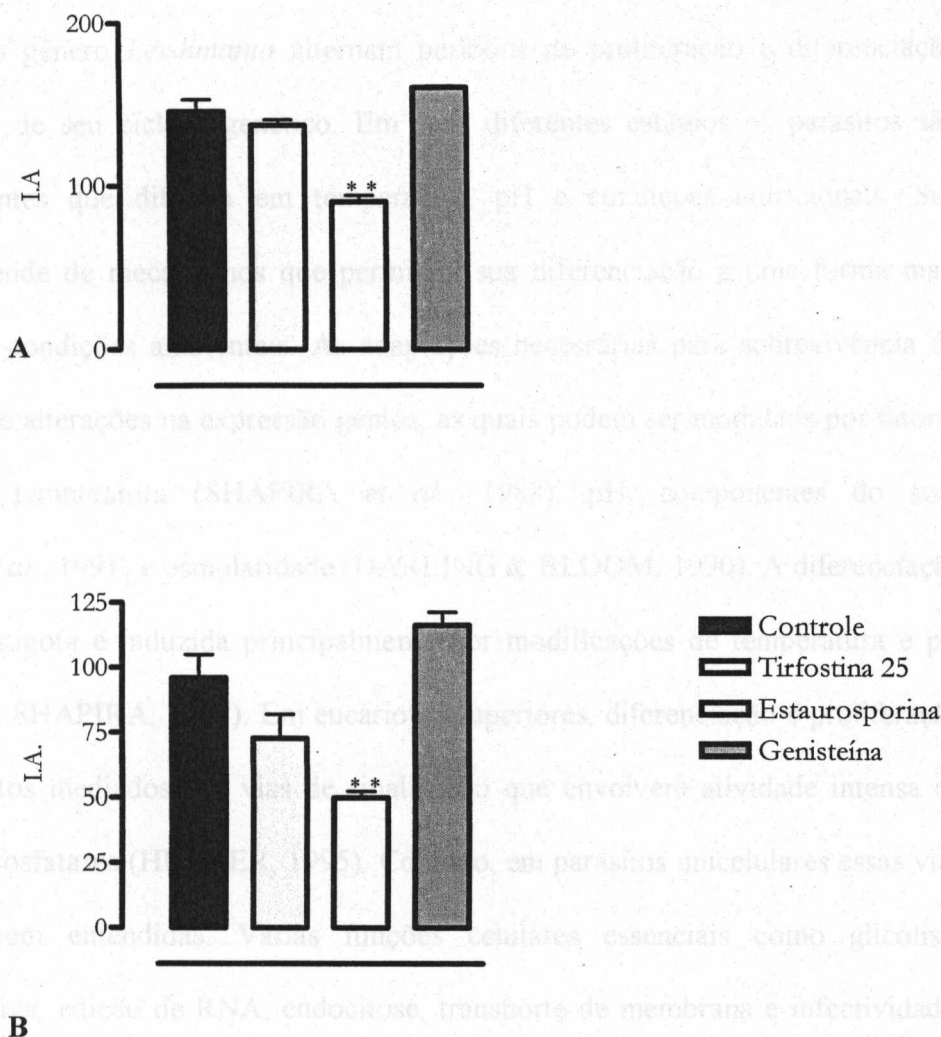


Figura 18: Efeito dos antagonistas de proteína cinases na invasão (1 hora – A) e sobrevivência (72 horas – B) de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Os parasitos foram tratados com tirfostina 25 150 μ M, estaurosporina 1 μ M e genisteína 100 μ M por 1 hora, a 27 °C e lavados em PBS antes da incubação com os macrófagos. Os dados apresentados são representativos de três experimentos independentes, realizados em triplicata nos quais foram contados 500 macrófagos. A relação parasito macrófago foi de 10:1 em A e 1:1 em B. Os resultados foram expressos como médias e desvios padrões. ** $p < 0,01$.

6. DISCUSSÃO

Protozoários do gênero *Leishmania* alternam períodos de proliferação e diferenciação celulares ao longo de seu ciclo digenético. Em seus diferentes estágios os parasitos são expostos a ambientes que diferem em temperatura, pH e condições nutricionais. Sua sobrevivência depende de mecanismos que permitam sua diferenciação a uma forma mais tolerante às novas condições ambientais. As adaptações necessárias para sobrevivência do parasito resultam de alterações na expressão gênica, as quais podem ser moduladas por fatores ambientais como temperatura (SHAPIRA *et al.*, 1988), pH, componentes do soro (ZILBERSTEIN *et al.*, 1991) e osmolaridade (DARLING & BLOOM, 1990). A diferenciação para a forma amastigota é induzida principalmente por modificações de temperatura e pH (ZILBERSTEIN & SHAPIRA, 1994). Em eucariotos superiores, diferenciação e proliferação celulares são eventos mediados por vias de sinalização que envolvem atividade intensa de proteína cinases e fosfatases (HUNTER, 1995). Contudo, em parasitos unicelulares essas vias não são muito bem entendidas. Várias funções celulares essenciais como glicólise, fosforilação oxidativa, edição de RNA, endocitose, transporte de membrana e infectividade, sofrem alterações durante a diferenciação e, por analogia a eucariotos superiores, provavelmente são controladas por cascatas de sinalização que envolvem a fosforilação de proteínas.

Antagonistas potentes e altamente específicos são necessários para elucidar o papel biológico de proteína cinases e em muitos casos tem apresentado potencial terapêutico no tratamento do câncer (AGRAWAL *et al.*, 2005; LEVITZKI, 1999, 2005; SPICER & HARPER, 2005; WAKELING, 2005). O uso de antagonistas específicos poderia bloquear a diferenciação de *Leishmania* para formas mais infectivas ou inibir sua replicação no hospedeiro vertebrado.

Para os nossos estudos utilizamos dois antagonistas da família das proteína tirosina cinases, genisteína e tirfostina 25 e um inibidor de amplo espectro, a estaurosporina.

As concentrações mais altas dos compostos tirfostina 25, genisteína e estaurosporina (150, 100 e 1 μ M, respectivamente) foram capazes de exercer atividade antiproliferativa em culturas de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Esse efeito foi evidenciado por uma inibição de aproximadamente 90% no número de parasitos, comprovando claramente o efeito citostático dos compostos. Nossos dados diferem significativamente dos obtidos anteriormente utilizando *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major* (BECKER & JAFFE, 1997), em que concentrações até 2,5 μ M de estaurosporina praticamente não inibiram o crescimento *in vitro*. Esses resultados possivelmente refletem diferenças metodológicas, uma vez que estes autores fizeram apenas um pré-tratamento de 60 min, enquanto que em nossos experimentos a droga foi mantida na cultura durante todo o período de duração do ensaio. As alterações morfológicas observadas por microscopia óptica em culturas tratadas com estaurosporina sugerem que a diferenciação do parasito foi afetada. Alterações semelhantes em culturas de *L. (L.) donovani* foram observadas após 12 horas de exposição à droga e a diferenciação promastigota-amastigota e amastigota-promastigota foi bloqueada, após 24 horas de exposição à estaurosporina (BLUM, 1994).

A inibição quase total do crescimento por estaurosporina, tirfostina 25 e genisteína pode ser explicada pelo fato de serem inibidores que apresentam marcante ação sobre receptores para fatores de crescimento, como EGFR. A dimerização induzida pelo reconhecimento do fator de crescimento leva à autofosforilação de seu domínio citoplasmático em resíduos de tirosina e ativação de vias posteriores, como Ras/MAPK e fatores de transcrição como

STATs, essenciais ao controle do crescimento celular. Homólogos de EGFR foram identificados em *Trypanosoma brucei* (HIDE *et al.*, 1989). Sabe-se que o EGF estimula o crescimento de formas procíclicas e sanguíneas desse parasito (HIDE, 1998). EGF também se liga a um receptor em formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* induzindo eventos de transdução de sinais e proliferação celular (GHANSAH *et al.*, 2002). Ensaio utilizando substratos sintéticos demonstraram que genisteína reduz a proliferação de formas sanguíneas de modo dose-dependente e inibe a atividade PTK em extratos de *T. brucei* (WHEELER-ALM & SHAPIRO, 1992).

Em *Leishmania*, foi demonstrado que calmodulina, uma proteína citossólica ligante de Ca^{2+} , é fosforilada após ativação de EGFR (BENAIM *et al.*, 1998). Além disso, outros fatores de crescimento, como fator de crescimento de insulina 1 (GOMES *et al.*, 1997) e fator de crescimento básico de fibroblasto (bFGF; KARDAMI *et al.*, 1992) também estimulam a proliferação desses parasitos, sugerindo a presença de receptores homólogos aos de mamíferos, que poderiam ser modulados por vias de sinalização análogas, e, portanto serem inibidos pelos antagonistas empregados.

Durante o crescimento e diferenciação *in vitro* de promastigotas, observa-se uma modificação no perfil protéico (SHAPIRA *et al.*, 1988) e no padrão de fosforilação de proteínas em resíduos de serina e treonina, mas a fosforilação em tirosina, ao contrário de mamíferos, é pouco afetada (DELL & ENGEL, 1994). A análise dos promastigotas tratados com os inibidores de proteína cinases revelou modificações no padrão de expressão de proteínas e inibição na fosforilação em resíduos de serina e tirosina, após os tratamentos, indicando que vias de sinalização responsáveis por regular a proliferação e a diferenciação podem ter sido afetadas e que a metacicloênese pode ter sido bloqueada ou retardada pelos tratamentos utilizados. Tempos mais longos de tratamento (superiores a 30 min.) e a quantificação de promastigotas metacíclicos devem ser testados para confirmar essa hipótese.

Analizamos a ultraestrutura de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratados com genisteína 100 μ M, tirfostina 25 150 μ M e estaurosporina 2 μ M por 24 horas. Foram observadas alterações na estrutura da mitocôndria única, presença de cisternas de retículo endoplasmático dilatadas envolvendo porções do citoplasma, sugestivo de processo autofágico e alterações no kDNA após o tratamento com tirfostina 25. Em outros tipos celulares, tirfostinas inibem a proliferação celular por dano mitocondrial, podendo atuar como desacopladores da fosforilação oxidativa (BURGER *et al.*, 1995). Genisteína e estaurosporina também ocasionam danos na função mitocondrial em adipócitos, mitocôndrias isoladas (SALVI *et al.*, 2002; YOUNG *et al.*, 1993), células T tumorais (BAXA *et al.*, 2005), mas tais alterações não foram induzidas pelo uso desses inibidores.

A atividade antiproliferativa dessas drogas pode se dever, ao menos em parte, à perturbação da homeostase mitocondrial, uma vez que pequenas flutuações nos níveis de ATP podem levar a uma série de fenômenos como inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas. A ação destes compostos sobre a estrutura e função mitocondrial tem grande importância na quimioterapia, uma vez que esta organela em *Leishmania* é afetada por várias drogas com atividade microbicida (VANNIER-SANTOS *et al.*, 1995; ZHAI *et al.*, 1995; DELORENZI *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2002). O dano mitocondrial também é um fator importante na apoptose. Apoptose induzida por estaurosporina, genisteína e tirfostinas em diferentes tipos celulares já foi anteriormente descrita (HEERDT *et al.*, 2000; YOON *et al.*, 2000; DUDZISZ-SLEDZ *et al.*, 2001). A indução de apoptose em *L. (L.) major* por estaurosporina também já foi anteriormente observada (ARNOULT *et al.*, 2002), mas em nossos resultados não encontramos indicativos desse evento celular.

O kDNA é composto por dois tipos de moléculas circulares, maxicírculos e minicírculos, formando uma rede na matriz mitocondrial (Cavalcanti *et al.*, 2004). Os maxicírculos apresentam 20.000-40.000 pares de base em 10-20 cópias, codificando rRNAs e proteínas

mitocondriais, enquanto os minicírculos são encontrados em número de cópias muito superior, aproximadamente 10.000, com mais de 1.000 pares de base codificando pequenos RNAs guia envolvidos no processo de edição do RNA (Morris *et al.*, 2000). Várias enzimas homólogas às de mamíferos participam da organização dessa rede, entre elas topoisomerases, que auxiliam no concatenamento dos círculos durante a replicação do DNA (SCHNEIDER, 2001). Tirfostinas inibem DNA topoisomerases do tipo I e II (AFLALO *et al.*, 1994; BENDETZ-NEZER *et al.*, 2004; MARKOVITS *et al.*, 1994) em mamíferos e podem estar atuando em *Leishmania*, o que poderia explicar as alterações estruturais observadas na organização do kDNA de promastigotas incubados com os antagonistas de PTK.

Outra alteração comumente observada em parasitos tratados, especialmente com genisteína e tirfostina 25, foi a presença de células com septação incompleta, apresentando flagelos e corpúsculos basais em número alterado (superior a dois). Esse fato pode ser devido à desorganização das estruturas nucleadoras de conformação em forma de “roda de carroça”, que na maioria dos protozoários estão presentes em número de 4 ou 5. Essas estruturas podem originar novos corpúsculos basais (MIGNOT, 1996). Em *Leishmania*, um distúrbio ao nível de sinalização celular poderia assincronizar as divisões nuclear e flagelar.

Nossos resultados indicam que estaurosporina e genisteína induzem um considerável aumento na BF do parasito, sugerindo alterações no mecanismo de transporte de vesículas, uma vez que essa é a única região responsável pela exocitose e endocitose em *Leishmania* (LANDFEAR & IGNATUSHCHENKO, 2001). O aumento no volume da bolsa flagelar induzido pelo tratamento com um modulador de proteína cinases (PMA, acetato de forbol miristato) foi descrito anteriormente pelo nosso grupo (VANNIER-SANTOS *et al.*, 1988) e esse aumento está associado a uma maior expressão de fosfatase ácida, especialmente a forma secretada (VANNIER-SANTOS *et al.*, 1995). Decidimos verificar se esta atividade estava sendo acumulada na bolsa flagelar em função da inibição da secreção da enzima para o meio

extracelular. Não foi detectado produto de reação acumulado no lúmen da BF por citoquímica, mas diversas vesículas foram encontradas nas redondezas do aparato de Golgi. Diversos membros da família de proteínas GTPases Rab participam do tráfego de vesículas e são fosforiladas, em resíduos de tirosina, quando super expressadas em células de mamíferos (DING *et al.*, 2003). Tirfostina 25 pode estar inibindo a fosforilação dessas proteínas, prejudicando o tráfego vesicular em *Leishmania*. Além disso, esses compostos também foram descritos como inibidores de formação de vesículas da rede *trans*-Golgi em células de mamíferos (AUSTIN & SHIELDS, 1996). Também é possível que a expressão da enzima tenha sido inibida ao nível transcricional ou traducional.

Outra alteração observada em parasitos tratados com genisteína foi a aparente junção entre a membrana do flagelo e da BF. É possível que a abertura da bolsa flagelar seja controlada por eventos de fosforilação, uma vez que foi observada marcação para anti-fosfotirosina em proteínas localizadas nessa região e por toda a superfície do flagelo (MARTINY *et al.*, 1996).

A interação *Leishmania*-macrófago é descrita como mediada por receptores e diversos sistemas receptor-ligante estão envolvidos (ALEXANDER & RUSSEL, 1992). Apesar de muitos grupos se dedicarem ao estudo da infecção de células hospedeiras por esses parasitos abordando o papel de receptores de superfície e as vias de sinalização envolvidas em macrófagos, pouco é conhecido a respeito de vias de sinalização envolvidas no parasito. O nosso grupo demonstrou que a atividade PKC de *L. (L.) amazonensis* pode modular sua interação com células hospedeiras via SAcP (VANNIER-SANTOS *et al.*, 1995). Com o objetivo de verificar o papel de proteína cinases do parasito na invasão da célula hospedeira, realizamos o pré-tratamento de promastigotas com os inibidores antes da interação com macrófagos peritoneais. Dos três antagonistas testados apenas estaurosporina foi capaz de inibir a invasão e a sobrevivência intracelular dos parasitos. Nossos resultados indicam que a atividade PTK do parasito parece não influenciar nos eventos de entrada e sobrevivência

intracelular, uma vez que os inibidores específicos da atividade dessa enzima não apresentaram efeito. Estaurosporina inibe diversas classes de proteína cinases, mas em mamíferos, age especialmente sobre PKC (TAMAOKI & NAKANO, 1990; GESCHER, 1998). Esse efeito pode estar relacionado com a inibição de AcP, possivelmente SAcP, cuja atividade pode ser modulada por isoformas de PKC (VANNIER-SANTOS *et al.*, 1995) e a qual apresentou atividade significativamente diminuída após tratamento com este antagonista. Trabalhos anteriores descreveram AcP ligada à membrana como um marcador de virulência em *Leishmania* (SINGLA *et al.*, 1992; KATAKURA & KOBAYASHI, 1988; LOVELACE & GOTTLIEB, 1986), mas estudos recentes verificaram que promastigotas mutantes nulos de *L. mexicana* para atividade dessa enzima são capazes de infectar macrófagos e desenvolver lesão em camundongos Balb/c de modo semelhante a parasitos selvagens (BENZEL *et al.*, 2000). O sucesso da infecção não depende de uma determinada molécula presente no parasito ou na célula hospedeira. É um fenômeno multifatorial no qual diversas moléculas do parasito e da célula hospedeira estão envolvidas.

Novas terapias podem ser desenvolvidas a partir do estudo de vias de sinalização do parasito, uma vez que a interrupção da transdução de sinais ou mesmo a indução de sinais impróprios poderia comprometer a sua capacidade de sobrevivência em seus hospedeiros. O uso de compostos com ação seletiva contra cascatas de sinalização celular pode ser utilizado para dissecar as vias presentes nestes protozoários, permitindo não somente a compreensão de fenômenos de biologia celular básica, como a evolução dessas vias e o mecanismo pelo qual *Leishmania* se tornou um parasito tão bem sucedido.

7 CONCLUSÕES

1. Proteína cinases estão relacionadas com a divisão celular de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.
2. Em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* a síntese e/ou maturação da enzima fosfatase ácida secretada é mediada por enzimas sensíveis a estaurosporina, genisteína e tirfostina 25.
3. Proteína cinases do parasito, particularmente com atividade PKC, estão envolvidas nos eventos de invasão e sobrevivência na célula hospedeira.
4. A atividade PTK de *Leishmania*, ao contrário do que ocorre na célula hospedeira, parece não interferir na entrada e na replicação intracelular dos parasitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFLALO, E.; IFTACH, S.; SEGAL, S.; GAZIT, A.; PRIEL, E. Inhibition of topoisomerase I activity by tyrphostin derivatives, protein tyrosine kinase blockers: mechanism of action. **Cancer Res.** **54**: 5138-5142, 1994.
- AGRAWAL, A.; GUTTERIDGE, E.; GEE, J.M.; NICHOLSON, R.I.; ROBERTSON, J. F. Overview of tyrosine kinase inhibitors in clinical breast cancer. **Endocr. Relat. Cancer**, **12**: 135-144, 2005.
- AKIYAMA, T.; ISHIDA, J.; NAKAGAWA, S.; OGAWARA, H.; WATANABE, S.; ITOH, N.; SHIBUYA, M.; FUKAMI, Y. Genistein, a Specific Inhibitor of Tyrosine-specific Protein Kinases. **J. Biol. Chem.**, **262**: 5592-5595, 1986.
- AKIYAMA, T.; OGAWARA, H. Use and specificity of genistein as inhibitor of protein tyrosine kinases. **Meth. Enzymol.**, **201**: 362-370, 1991.
- ALEXANDER, J.; RUSSELL, D.G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **Adv. Parasitol.**, **31**: 175-254, 1992.
- ALMEIDA, M.C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **98**: 861-870, 2003.
- ALMEIDA, R. P.; BARRAL-NETTO, M.; DE JESUS, A. M.; DE FREITAS, L.A.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **54**: 178-184, 1996.

ARNOULT, D.; AKARID, K.; GRODET, A.; PETIT, P.X.; ESTAQUIER, J.; AMEISEN, J.C. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. **Cell Death Differ.**, 65-81, 2002.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, **30**: 1269-1281, 2000.

AUSTIN, C.D. ; SHIELDS, D. Formation of nascent secretory vesicles from the trans-Golgi network of endocrine cells is inhibited by tyrosine kinase and phosphatase inhibitors. **J. Cell Biol.**, **135**: 1471-1483, 1996.

BALANÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R.; CUBRIA, J.C.; ORDONEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen. Pharmacol.**, **30**: 435-444, 1998.

BALCZON, R.; BAO, L.; ZIMMER, W.E.; BROWN, K.; ZINKOWSKI, R.P.; BRINKLEY, B.R. Dissociation of centrosome replication events from cycles of DNA synthesis and mitotic division in hydroxyurea-arrested Chinese hamster ovary cells. **J. Cell Biol.**, **130**: 105-115, 1995.

BAHR, V.; STIERHOF, Y.D.; ILG, T.; DEMAR, M.; QUINTEN, M.; OVERATH, P. 1993. Expression of lipophosphoglycan, high molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **58**: 107-122, 1993.

BARCINSKI, M.A.; MOREIRA, M.E.; BALANCO, J.M.; WANDERLEY, J.L.; BONOMO, A.C. The role of apoptotic mimicry in host-parasite interplay: is death the only alternative for altruistic behavior? **Kinetoplastid Biol. Dis.**, **25**: 6, 2003.

BARCINSKI, M.A.; SCHECHTMAN, D.; QUINTAO, L.G.; COSTA, D.de A.; SOARES, L.R.; MOREIRA, M.E.; CHARLAB, R. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases the infectivity of *Leishmania amazonensis* by protecting promastigotes from heat-induced death. **Infect. Immun.**, **60**: 3523-3527, 1992.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.;
MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.;
BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **44**: 536-546, 1991.

BATES, P.A. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. **Exp. Parasitol.**, **79**: 215-218, 1994.

BATES, P.A.; KURTZ, M.K.; GOTTLIEB, M.; DWYER, D.M. *Leishmania donovani*: generation of monospecific antibody reagents to soluble acid phosphatase. **Exp Parasitol.**, **64**: 157-164, 1987.

BATES, P.A.; ROBERTSON, C.D.; COOMBS, G.H. Expression of cysteine proteinases by metacyclic promastigotes of *Leishmania mexicana*. **J Eukaryot Microbiol.** **41**: 199-203, 1994.

BAXA, D.M.; LUO, X.; YOSHIMURA, F.K. Genistein induces apoptosis in T lymphoma cells via mitochondrial damage. **Nutr. Cancer**, **51**: 93-101, 2005.

BECKER, S.; JAFFE, C. Effect of protein kinase inhibitors on growth, morphology and infectivity of *Leishmania* promastigotes. **Parasitol. Res.**, **83**: 273-280, 1997.

BENAIM, G.; CERVINO, V.; VILLALOBO, A. Comparative phosphorylation of calmodulin from trypanosomatids and bovine brain by calmodulin-binding protein kinases. **Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, **120**: 57-65, 1998.

BEN-BASSART, H. Biological activity of tyrosine kinase inhibitors: novel agents for psoriasis therapy. **Curr. Opin. Investig. Drugs**, **2**: 1539-1545, 2001.

BENDETZ-NEZER, S.; GAZIT, A.; PRIEL, E. DNA topoisomerase I as one of the cellular targets of certain tyrophostin derivatives. **Mol Pharmacol**. **66**: 627-634, 2004.

BENGS, F.; SCHOLZ, A.; KUHN, D.; WIESE, M. LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in *Leishmania mexicana*. **Mol. Microbiol.**, **55**: 1606-1615, 2005.

BENZEL, I.; WEISE, F.; WIESE, M. Deletion of the gene for the membrane-bound acid phosphatase of *Leishmania mexicana*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **111**: 77-86, 2000.

BERENGUER, J.; GOMEZ-CAMDERA, F.; PADILLA, B.; RODRIGUEZ-FERRERO, M.; ANAYA, F.; MORENO, S.; VALDERRABANO, F. Visceral leishmaniasis (Kala-Azar) in transplant recipients: case report and review. **Transplantation**, **65**: 1401-1404, 1998.

BERGAMASCHI, G.; ROSTI, V.; DANOVA, M.; PONCHIO, L.; LUCOTTI, C.;

CAZZOLA, M. Inhibitors of tyrosine phosphorylation induce apoptosis in human leukemic cell lines. **Leukemia**, 7: 2012-2018, 1993.

BIANCO, C.; GRIFFIN F.M. JR; SILVERSTEIN S.C. Studies of the macrophages complement receptor. Alterations of receptor function upon macrophage activation. **J. Exp. Med.**, 141: 1278-1290, 1975.

BISHOP, J. M. The molecular genetics of cancer. **Science**, 235: 305-311, 1987.

BLUM, J.J. Effect of hypoxia, acute osmotic stress and protein kinase inhibitors on the intermediary metabolism of *Leishmania*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, 41: 1-8, 1994.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, N.; SOLBACH, W. Evasion strategies of *Leishmania* parasites. **Parasitol. Today**, 6: 183-187, 1990.

BOGDAN, C.; DONHAUSER, N.; DORING, R.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A.; RITTIG, M.G. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. **J. Exp. Med.**, 191: 2121-2130, 2000.

BOEHM, U.; KLAMP, T.; GROOT, M.; HOWARD, J.C. Cellular responses to interferon-gamma. **Annu. Rev. Immunol.**, 15: 749-795, 1997.

BORDIER, C. The promastigotes surface protease of *Leishmania*. **Parasitol. Today**, **3**: 151-53, 1987.

BOSHART, M.; MOTTRAN, J.C. Protein phosphorylation and protein kinases in trypanosomatids. In: HIDE, G.; MOTTRAN, J.C.; COOMBS, G.H.; HOLMES, P.H. (Eds.) **Trypanosomiasis and leishmaniasis: biology and control**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1997. p. 227-244.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**: 248-254, 1976.

BRITTINGHAM, A.; MORRISON, C.J.; MCMASTER, W.R.; MCGWIRE, B.S.; CHANG, K.P.; MOSSER, D.M. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **J. Immunol.**, **155**: 3102-3111, 1995.

BUCHMÜLLER-ROUILLER, Y.; MAUËL, J. Impairment of the oxidative metabolism of mouse peritoneal macrophages by intracellular *Leishmania* spp. **Infect. Immun.**, **55**: 587-593, 1987.

BURGER, A.M.; KAUR, G.; ALLEY, M.C.; SUPKO, G.; MALSPEIS, L.; GREVER, M.R.; SAUSVILLE, E.A. Tyrphostin AG17, [(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzylidene)-malononitrile], inhibits cell growth by disrupting mitochondria. **Cancer Res.**, **55**: 2794-2799, 1995.

CAMPOS-PONCE M, PONCE C, PONCE E, MAINGON RD. *Leishmania chagasi/infantum*: further investigations on *Leishmania* tropisms in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. **Exp Parasitol.** **109**: 209-219, 2005.

CAVALCANTI, D.P., FRAGOSO, S.P., GOLDENBERG, S., DE-SOUZA, W., MOTTA, M.C.M. The effect of topoisomerase II inhibitors on the kinetoplast ultrastructure. **Parasitol Res** **94**: 439-448, 2004.

CHANG, K. P. Cellular and molecular mechanisms of intracellular symbiosis in leishmaniasis. **Int. Rev. Cytol. Suppl.**, **14**: 267-305, 1983.

CHANG, K.P.; CHAUDHURI, G.; FONG, D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. **Annu. Rev. Microbiol.** **44**: 499– 529, 1990.

CHANG, K.P. *Leishmania* virulence and genetic heterogeneity. **Clin. Dermatol.**, **17**: 269-273, 1999.

CHAUDHURI, G.; CHANG, K.P. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **27**: 43-52, 1988.

CLAYTON, C.; HAUSLER, T.; BLATTNER, J. Protein trafficking in kinetoplastid protozoa. **Microbiol. Rev.**, **59**: 325-344, 1995.

COOL, D.E.; BLUM, J.J. Protein tyrosine phosphatase activity in *Leishmania donovani*. **Mol. Cell Biochem.**, **127/128**: 143-149, 1993.

CORRADIN, S.; MAUEL, J.; RANSIJN, A.; STURZINGER, C.; VERGERES, G. Down-regulation of MARCKS-related protein (MRP) in macrophages infected with *Leishmania*. **J. Biol. Chem.**, **274**: 16782-16787, 1999.

CORRADIN, S.; RANSIJN, A.; CORRADIN, G.; ROGGERO, M.A.; SCHMITZ, A.A.; SCHNEIDER, P.; MAUEL, J.; VERGERES, G. MARCKS-related protein (MRP) is a substrate for the *Leishmania major* surface protease leishmanolysin (gp63). **J. Biol. Chem.**, **274**: 25411-25418, 1999.

COSSART, P.; SANSONETTI, P.J. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. **Science**, **304**: 242-248, 2004.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. **Exp. Mol. Parasitol.**, **72**: 132-141, 2001.

DARLING, T.N.; BLOOM J.J. Changes in the shape of *Leishmania major* promastigotes in response to hexoses, praline and hypo-osmotic stress. **J. Protozool.**, **37**: 267-272, 1990.

DAVIES, C.E.; COOPER, A.M.; PEACOCK, C.; LANE, R.P.; BLACKWELL, J.M. Expression of LPG and gp63 by different development stages of *Leishmania major* in the sandfly, *Phlebotomus papatasi*. **Parasitology**, **101**: 337-343, 1990.

DE CASTRO, S.L.; LUZ, M.R. The second messenger cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in pathogenic microorganisms with special reference to protozoa. **Can. J. Microbiol.**, **39**: 473-479, 1993.

DELL, K.R.; ENGEL, J.N. Stage-specific regulation of protein phosphorylation in *Leishmania major*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **64**: 283-292, 1994.

DELORENZI, J.C.; ATTIAS, M.; GATTASS, C.R.; ANDRADE, M.; REZENDE, C.; DA CUNHA PINTO, A.; HENRIQUES, A.T.; BOU-HABIB, D.C.; SARAIVA, E.M. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **45**: 1349-1354, 2001.

DESCOTEAUX, A.; MATLASHEWSKI, G. *c-fos* and tumor necrosis factor gene expression in *Leishmania donovani* infected macrophages. **Mol. Cell Biol.**, **9**: 5223-5227, 1989.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S.J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. **Biochim. Biophys. Acta**, **1455**: 341-352, 1999.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S.J. Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. **Microbes Infect.** **4**: 975-981, 2002.

DESJARDINS, M. Biogenesis of phagolysosomes: the kiss and run hypothesis. **Trends Cell Biol.**, **5**: 183-186, 1995.

DESJEUX, P. **Information on the epidemiology and control of the leishmaniasis by country or territory.** WHO Bull, WHO/LEISH/91.30. 1990.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **World Health Stat. Q.**, **45**: 267-275, 1992.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, **27**: 305-318, 2004.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. *Leishmania*/ HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **97**: 3-15, 2003.

DILLON, R.J.; LANE, R.P. Detection of *Leishmania* lipophosphoglycan binding proteins in the gut of the sandfly vector. **Parasitology** **118**: 27-32, 1999.

DING, J.; SOULE, G.; OVERMEYER, J.H.; MALTESE, W.A. Tyrosine phosphorylation of the Rab24 GTPase in cultured mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun.** **312**: 670-675, 2003.

DOCAMPO, R.; MORENO, S.N.J. The role of calcium in the process of cell invasion by intracellular parasites. **Parasitol. Today**, **12**: 61-65, 1996.

DOCAMPO, R.; MORENO, S.N.J. Acidocalcisome: a novel Ca^{+2} storage compartment in trypanosomatids e Apicomplexan parasites. **Parasitol. Today**, **15**: 443-448, 1999.

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

DOCAMPO, R.; MORENO, S.N.J. Calcium regulation in protozoan parasites. **Curr. Opin. Microbiol.**, **6**: 359-364, 2003.

DOMÍNGUEZ, M.; MORENO, I.; AIZPURUNA, C.; TORANÕ, A. Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. **Microbes Infect.**, **5**: 507-513, 2003.

DOMÍNGUEZ, M.; TORANÕ, A. Immune Adherence-mediated Opsonophagocytosis: The Mechanism of *Leishmania* Infection. **J. Exp. Med.**, **189**: 25-35, 1999.

DOYLE, O.S; DWYER, D.M. *Leishmania*: immunochemical comparison of the secretory (extracellular) acid phosphatases from various species. **Exp Parasitol.**, **77**: 435-444, 1993.

DUBOISE, M.; VANNIER-SANTOS, M. A.; COSTA-PINTO, D.; RIVAS, L.; PAN, A. A.; TRAUB-CSEKO, Y.; DE SOUZA, W.; MCMAHON-PRATT, D. The biosynthesis, processing and immunolocalization of *Leishmania pifanoi* amastigote cysteine proteinases. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **68**: 119-132, 1994.

DUDZISZ-SLEDZ, M.; MIZERSKI, G.; MARZEC, B.; KORSZEN-PILECKA, I.; RUDZKI, S.; WOJCIEROWSKI, J.; MANDZIUK, S. Effect of tyrphostins on programmed cell death in colon adenocarcinoma cell line LS-180. **Folia Histochem. Cytobiol.**, **39**: 81-83, 2001.

DWYER, D. M.; GOTTLIEB, M. The surface membrane chemistry of *Leishmania*: its possible role in parasite sequestration and survival. **J. Cell Biochem.**, **23**: 35-45, 1983.

EILAM, Y; EL ON, J; SPIRA, D T. Leishmania major: excreted factor, calcium ions and the survival of amastigotes. **Exp. Parasitol.**, **59**: 161-168, 1985.

ELTOUM I, A.; ZIJLSTRA, E. E.; ALI, M. S.; GHALIB, H. W.; SATTI, M. M.; ELTOUM, B.; EL-HASSAN, A. M. Congenital kala-azar and leishmaniasis in the placenta. **Am. J. Trop. Méd. Hyg.**, **46**: 57-62, 1992.

FADOK, V.A.; VOELKER, D.R.; CAMPBELL, P.A.; COHEN, J.J.; BRATTON, D.L.; HENSON, P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **J Immunol.**, **148**: 2207-2216, 1992.

FELICIANGELI, M.D.; DELGADO, O.; SUAREZ, B.; CHIURILLO, MA. The burden of the *Leishmania chagasi/infantum* infection in a closed rural focus of visceral leishmaniasis in Lara state, west-central Venezuela. **Trop Med Int Health.** **10**: 444-449, 2005.

FLAWIÁ, M.; TÉLLEZ-IÑÓN, M.T.; TORRES, H.N. Signal Transduction Mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Today** **13**: 30-33, 1997.

FUNASA. **Bol. Eletr. Epidemiol.**, **1**(1): 12.03.2001.

GARD, D. L.; HAFEZI, S.; ZHANG, T.; DOXSEY, S. J. Centrosome duplication continues in cycloheximide-treated *Xenopus* blastulae in the absence of a detectable cell cycle. **J. Cell Biol.**, **110**: 2033-2042, 1990.

GENESTRA, M.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON, L. Protein Kinase A activity is associated with metacyclogenesis in *Leishmania amazonensis*. **Cell Biochem. Funct.**, **22**: 315-320, 2004.

GESCHER, A. Analogs of staurosporine: potential anticancer drugs? **Gen. Pharmacol.**, **31**:721-728, 1998.

GHANSAH, T.J.; AGER, E.C.; FREEMAN-JUNIOR, P.; VILLALTA, F.; LIMA, M.F. Epidermal growth factor binds to a receptor on *Trypanosoma cruzi* amastigotes inducing signal transduction events and cell proliferation. **J Eukaryot Microbiol.** **49**: 383-390, 2002.

GOMES, C. M.; GOTO, H.; CORBETT, C. E.; GIDLUND, M. Insulin-like growth factor-1 is a growth promoting factor for *Leishmania* promastigotes. **Acta Trop.**, **64**: 225-228, 1997.

GOMES C M; GOTO H; MAGNANELLI A C; MONTEIRO H P; SOARES R P S; COBERTT C E P; GIDLUND M. Characterization of the Receptor for Insulin-Like Growth Factor on *Leishmania* Promastigotes. **Exp. Parasitol.** **99**: 190-197, 2001.

GOSSAGE, S.M.; ROGERS, M.E.; BATES, P.A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **Int. J. Parasitol.**, **33**: 1027-1034, 2003.

GOTO, H.; GOMES, C.M.C.; CORBETT, C.E.P.; MONTEIRO, H.P.; GIDLUND, M.

Insuline-like growth factor (IGF)-1 is a growth promoting factor for *Leishmania* promastigotes and amastigotas. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, **95**: 13211-13216, 1998.

GOTTLIEB, M.; DWYER, D. Protozoan parasite of humans: surface membrane with externally disposed acid phosphatase. **Science**, **212**: 939-941, 1981a.

GOTTLIEB, M.; DWYER, D. *Leishmania donovani*: surface membrane acid phosphatase activity of promastigotes. **Exp. Parasitol.**, **52**: 117-128, 1981b.

GOTTLIEB, M.; DWYER, D. Identification and partial characterization of an extracellular acid phosphatase activity of *Leishmania donovani* promastigotes. **Mol. Cell Biol.**, **2**: 76-81, 1982.

GRIMALDI, JUNIOR, G. ; MCMAHON-PRATT, D. Leishmaniasis and its etiologic in the New World: an overview. **Prog. Clin. Parasitol.**, **2**: 73-118, 1991.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, **6**: 230-250, 1993.

HALL, L. R.; TITUS, R. G. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. **J. Immunol.**, **155**: 3501-3506, 1995.

HASSAN, P.; FERGUSSON, D.; GRANT, M. K.; MOTTRAN, C. J. The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of *Leishmania mexicana*. **Parasitol. Today**, **113**: 189-198, 2001.

HEERDT, B. G.; HOUSTON, M. A.; MARIADASON, J. M.; AUGENLICHT, L. H. Dissociation of staurosporine-induced apoptosis from G₂-M arrest in SW620 human colonic carcinoma cells: initiation of the apoptotic cascade is associated with elevation of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)¹. **Cancer Res.**, **60**: 6704-6713, 2000.

HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, **25**: 363-370, 2000.

HERMOSO, T.; FISHELSON, Z.; BECKER, S. I.; HIRSCHBERG, K.; JAFFE, C. L. Leishmanial protein kinase phosphorylate components of the complement system. **EMBO J.**, **10**: 4061-4067, 1991.

HERMOSO, T.; JAFFE, C. L. Phosphorylation of proteins in virulent promastigotes from *Leishmania major*. **Biol. Res.**, **26**: 267-271, 1993.

HESPANHOL, R.C.; DE NAZARE, C.; SOEIRO, M.; MEUSER, M.B.; DE NAZARETH, S. L.; MEIRELLES, M.; CORTE-REAL, S. The expression of mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in *Leishmania (L.) amazonensis* invasion. **J. Histochem. Cytochem.**, **53**: 35-44, 2005.

HEY, A.S.; THEANDER, T.G.; HVIID, L.; HAZRATI, S.M.; KEMO, M.; KHARAZMI, A.

The major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major* and *Leishmania donovani* cleaves CD4 molecules on human T cells. **J. Immunol.**, **152**: 4542-4548, 1994.

HIDE, G. Mammalian epidermal growth factor stimulates G-protein activity in *Trypanosoma brucei*. **Parasitol. Res.**, **84**: 143-146, 1998.

HIDE, G.; GRAY, A.; HARRISON, C.M.; TAIT, A. Identification of an epidermal growth factor receptor homologue in trypanosomes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **36**: 51-60, 1989.

HUA, S.B.; WANG, C.C. Interferon-gamma activation of a mitogen-activated protein kinase, KFR1, in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. **J. Biol. Chem.**, **272**: 10797-10803, 1997.

HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell**, **80**: 225-236, 1995.

KANE, M.M.; MOSSER, D.M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Curr. Opin. Hematol.**, **7**: 26-31, 2000.

KARDAMI, E.; PEARSON, T.W.; BEECROFT, R.P.; FANDRICH, R.R. Identification of basic fibroblast growth factor-like proteins in african trypanosomes and *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **51**: 171-182, 1992.

KATAKURA, K.; KOBAYASHI, A. Acid phosphatase activity of virulent and avirulent clones of *Leishmania dovani* promastigotes. **Infect. Immun.**, **56**: 2856-2860, 1988.

KILLICK-KENDRICK R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, **65**: 37-42, 1990a.

KILLICK-KENDRICK, R.; MOLYNEUX, D.H. Interrupted feeding of vectors. **Parasitol Today**. **6**: 188-189, 1990b.

KUBAR, J.; QUARANTA, J.F.; MARTY, P.; LELIEVRE, A.; LE FICHOUX, Y.; AUFEUVRE, J. P. Transmission of *L. infantum* by blood donors. **Nat. Med.**, **34**: 368, 1997.

KUHN, D.; WIESE, M. LmxPK4, a mitogen-activated protein kinase kinase homologue of *Leishmania mexicana* with a potential role in parasite differentiation. **Mol. Microbiol.** **56**: 1169-1182, 2005.

KWIATKOWSKA, K.; SOBOTA, A. Signaling pathways in phagocytosis. **Bioessays**, **21**: 422-431, 1999.

LAISON, R.; RYAN, L; SHAW, J.J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **82**: 421-424, 1987.

LANDFEAR, S.; IGNATUSHCHENKO, M. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **115**: 1-17, 2001.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends Microbiol.** **11**: 210-214, 2003.

LAUFS, H.; MULLER, K.; FLEISCHER, J.; REILING, N.; JAHNKE, N.; JENSENIUS, J.C.; SOLBACH, W.; LASKA, Y. T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infect. Immun.**, **70**: 826-835, 2002.

LEE YJ, PANEK RB, HUSTON M, BENVENISTE EN. 1995. Role of protein kinase C and tyrosine kinase activity in IFN-gamma-induced expression of the class II MHC gene. *Am J Physiol.* **268**: 127-37.

LEVITZKI, A. Tyrophostins: tyrosine kinase blockers as novel antiproliferative agents and dissectors of signal transduction. **FASEB J.**, **6**: 3275-3282, 1992.

LEVITZKI, A. Protein tyrosine kinase inhibitors as novel therapeutic agents. **Pharmacol. Ther.**, **82**: 231-239, 1999.

LEVITZKI, A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. **Eur. J. Cancer**, **38**: 11-18, 2005.

LEVITZKI, A.; GAZIT, A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. **Science**, **267**: 1782-1788, 1995.

LIPPERT, D.N.; DWYER, D.W.; LI, F.; OLAFSON, R.W. Phosphoglycosylation of a secreted acid phosphatase from *Leishmania donovani*. **Glycobiology**, **9**: 627-636, 1999.

LOPEZ-VELEZ, R.; PEREZ-MOLINA, J.A.; GUERRERO, A.; BAQUERO, F.; VILLARRUBIA, J.; ESCRIBANO, L. Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **58**: 436-443, 1998.

LOVELACE, J.K.; GOTTLIEB, M. Comparison of extracellular acid phosphatases from various isolates of *Leishmania*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **35**: 1121-1118, 1986.

LU, H.G.; ZHONG, L.; CHANG, K.P.; DOCAMPO, R. Intracellular Ca^{2+} pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes. **J. Biol. Chem.**, **272**: 9464-9473, 1997.

LUZ, K.G.; DA SILVA, V.O.; GOMES, E.M.; MACHADO, F.C.; ARAUJO, M.A.; FONSECA, H.E.; FREIRE, T.D.; D'ALMEIDA, J.B.; PALATINIK, M.; PALATINIK-DE SOUZA, C.B. Prevalence of anti-*Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and multiply transfused hemodialysis patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **57**: 168-171, 1997.

MALLINSON, D.J.; COOMBS, G.H. Interaction of *Leishmania* metacyclis with macrophages. **Int. J. Parasitol.**, **19**: 647-656, 1989.

MANSFIELD, J M; OLIVIER, M. Immune evasion by parasites. In: KAUFMANN, S. H. E; AHMED, R. **Immunology of infectious diseases**. Washington, D.C.: ASM Press, 2002. p. 379-392.

MARKOVITS J, LARSEN AK, SEGAL-BENDIRDJIAN E, FOSSE P, SAUCIER JM, GAZIT A, LEVITZKI A, UMEZAWA K, JACQUEMIN-SABLON A. Inhibition of DNA topoisomerases I and II and induction of apoptosis by erbstatin and tyrphostin derivatives. **Biochem Pharmacol.** **48**: 549-560, 1994.

MARTINY, A.; MEYER-FERNANDES, J.R.; DE SOUZA, W.; VANNIER-SANTOS, M.A. Altered tyrosine phosphorylation of ERK1 MAP kinase and other macrophage molecules caused by *Leishmania* amastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **102**: 1-112, 1999.

MARTINY, A.; VANNIER-SANTOS, M.A.; BORGES, V.M.; MEYER-FERNADES, J.R.; CUNHA-E-SILVA, N.L.; DE SOUZA, W. *Leishmania*-induced tyrosine phosphorylation in the host macrophage and its implication to infection. **Eur. J. Cell Biol.**, **71**: 206-215, 1996.

MARTINY, A.; VANNIER-SANTOS, M.A. *Leishmania*-Host Interplay: The everlasting Rivalry. *Medical Chemistry Reviews – Online* 000-000, 2005.

MEAGHER, L.C.; SAVILL, J.S.; BAKER, A.; FULLER, R.W.; HASLETT, C. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2. **J. Leukoc. Biol.**, **52**: 269-273, 1992.

- MESHNICK, S.R.; EATON, J. W. Leishmanial superoxide dismutase: a possible target for chemotherapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**: 970-976, 1981.
- MIGNOT, J.P. Nouvelles hypothèses sur la réplication des centrioles et des corps basaux. *C R Acad. Sci. Paris*, **319**: 1093-1099, 1996.
- MISRA, S.; NASKAR, K.; SARKAR, D. Role of Ca¹² ion in *Leishmania*-macrophage attachment. *Mol. Cell Biochem.*, **102**: 13-8, 1991.
- MODLIN, R.L.; TAPIA, F.J.; BLOOM, B.R.; GALLINOTO, M.E.; CASTES. M.; RONDON, A.J.; REA, T.H.; CONVIT, J. *In situ* characterization of the celular immune response in american cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* **60**: 241-248, 1985.
- MOLL H. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunol. Today*, **14**: 383-387, 1993.
- MOORE, K.J.; LABRECQUE, S.; MATLASHEWSKI, G. Alteration of *Leishmania donovani* infection levels by selective impairment of macrophage signal transduction. *J. Immunol.*, **150**: 4457-4465, 1993.
- MORRIS, J.C., DREW, M.E., KLINGBEIL M.M., MOTYKA, S.A., SAXOWSKY, T.T., WZNG, Z., ENGLUND, P.T. Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. *Int. J. Parasitol* **31**: 453-458.

MORTENSEN, R.F.; ZHONG, W. Regulation of phagocytic leukocyte activities by C-reactive protein. **J. Leukoc. Biol.**, **67**: 495-500, 2000.

MOSSER, D.M.; BRITTINGHAM, A. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. **Parasitology**, **115**: 9-23, 1997.

MOSSER, D.M.; ROSENTHAL, L.A. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. **Semin. Cell Biol.**, **4**: 315-322, 1993.

MOTTRAM, J.C.; BROOKS, D.R.; COOMBS, G.H. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. **Curr. Opin. Microbiol.**, **1**: 455-460, 1998.

MOTTRAM, J.C.; KINNAIRD, J.H.; SHIELS, B.R.; TAIT, A.; BARRY, J.D. A novel CDC2-related protein kinase from *Leishmania mexicana*, LmmCRK1, is post-translationally regulated during the life cycle. **J. Biol. Chem.**, **268**: 21044-21052, 1993.

MOYERSOEN, J.; CHOE, J.; FAN, E.; HOL, W.G.; MICHELS, P.A. Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target. **FEMS Microbiol. Rev.**, **28**: 603-643, 2004.

MUKHOPADHYAY, N.K.; SAHA, A.K.; LOVELACE, J.K.; DA SILVA, R.; SACKS, D.L.; GLEW, R.H. Comparison of the protein kinase and acid phosphatase activities of five species of *Leishmania*. **J. Protozool.**, **35**: 601-607, 1988.

MURRAY, H.W.; NATHAN C.F. Macrophage microbicidal mechanisms in vitro: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **J. Exp. Med.**, **189**:741-746, 1999.

MUSKUS, C.E.; MARIN VILLA, M. Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. **Biomedica**, **22**: 167-177, 2002.

MUSTAFA E, BAKHIET M, JASTER R, BITTORF T, MIX E, OLSSON T. 1997. Tyrosine kinases are required for interferon-gamma-stimulated proliferation of *Trypanosoma brucei*. **J. Infect. Dis.**, **175**: 669-673, 1997.

MUSTELIN, T.; HUNTER, T. Meeting at mitosis: cell cycle-specific regulation of c-Src by RPTPalpha. **Sci STKE**, **15**: PE3, 2002.

NANDAN, D.; REINER, S.L. Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*: selective inhibition of signaling through Janus Kinases and Stat1. **Infect. Immun.**, **63**: 4495-4500, 1995.

NAULA, C.; SEEBECK, T. Signaling in trypanosomatids. **Parasitol. Today**, **16**: 35-38, 2000.

NATHAN, C; XIE, Q. W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, **269**: 13725-13728, 1994.

OKAJIMA, F.; AKBAR, M.; MAJID, M.; SHO, K.; TOMURA, H.; KONDO. Genistein, an Inhibitor of Protein Tyrosine Kinase, Is Also a Competitive Antagonist for P₁ – Purinergic (Adenosine) Receptor in FRTL-5 Thyroid Cells. **Biochem. Bioph. Res. Comm.**, **203**: 1488-1495, 1994.

OLIVIER, M; BAIMBRIDGE K G; REINER, N E. Stimulus-response coupling in monocytes infected with *Leishmania* – attenuation of calcium transients is related to defective agonist-induced accumulation of inositol phosphates. **J. Immunol.**, **148**: 1188-1196, 1992.

OLIVIER, M.; BROWNSEY, R.W.; REINER, N.E. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. **Proc. Nat. Acad. Sci USA**, **89**: 7481-7485, 1992.

OLIVIER, M; BADARÓ, R.; MEDRANO, F.J.; MORENO J. The pathogenesis of *Leishmania*/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **97**: 79-98, 2003.

OLIVIER, M.; GREGORY, D.J.; FORGET, G. Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. **Clin. Microbiol. Rev.**, **18**: 293- 305, 2005.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resist Updat.**, **7**: 257-266, 2004.

PAREDES, R.; MUNOZ, J.; DIAZ, I.; DOMINGO, P.; GURGUI, M.; CLOTET, B. Leishmaniasis in HIV infection. **J. Postgrad. Med.**, **49**: 39-49, 2003.

PARSON, M.; CARTER, V.; MUTHIANI, A.; MURPHY, N. *Trypanosoma congolense*: developmental regulation of protein kinases and tyrosine phosphorylation during the life cycle. **Exp. Parasitol.**, **80**: 507-514, 1995.

PARSONS, M.; RUBEN, L. Pathways involved in environmental sensing in Trypanosomatids. **Parasitol. Today**, **16**: 56-62, 2000.

PARSONS, M.; VELENTINE, M.; CARTER, V. Protein kinases in divergent eukaryotes: identification of protein kinase activities regulated during trypanosome development. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, **90**: 2656-2660, 1993.

PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, **22**: 1-13, 1996.

PEREZ-ALVAREZ, M.J.; LARRETA, R.; ALONSO, C.; REQUENA, J.M. Characterization of a monoclonal antibody recognizing specifically the HSP70 from *Leishmania*. **Parasitol. Res.**, **87**: 907-910, 2001.

PETERS, C.; AEBISCHER, T.; STIERHOF, Y-D.; FUCHS, M.; OVERATH, P. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. **J. Cell Sci.**, **108**: 3715-3724, 1995.

- PIMENTA, P.F.; DE SOUZA, W. *Leishmania mexicana*: distribution of intramembranous particles and filipin sterol complexes in amastigotes and promastigotes. **Exp. Parasitol.**, **63**: 117-135, 1987.
- PIMENTA, P.F.; SARAIVA, E.M.; SACKS, D.L. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. **Exp. Parasitol.**, **72**: 191-204, 1991.
- PINTADO, V.; LOPEZ-VELEZ, R. HIV-associated visceral leishmaniasis. **Clin. Microbiol. Infect.**, **7**: 291-300, 2001.
- PROUDFOOT, L.; O'DONELL, C.A.; LIEW, F.Y. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. **Eur. J. Immunol.**, **25**: 745-750, 1995.
- PROUDFOOT, L.; NIKOLAEV, A.V.; FENG, G.J.; WEI, W.Q.; FERGUSON, M.A.; BRIMACOMBE, J.S.; LIEW, F.Y. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **93**: 10984-10989, 1996.
- PUNTES, S.M.; DA SILVA, RP; SACKS, DL; HAMER, CH; JOINER, KA. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5-9. **J. Immunol.**, **145**: 4311-4316, 1990.

- PUENTES, S.M.; DWYER, D.M.; BQTES, P.A.; JOINER, K.A. Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. **J. Immunol.**, **25**: 745-750, 1989.
- QURESHI, A.A.; ASAHINA, A.; OHNUMA, M.; TAJIMA, M.; GRANSTEIN, R.D.; LERNER, E.A. Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **54**: 665-671, 1996.
- REINER, N.E.; NG W, MCMASTER WR. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. **J. Immunol.**, **138**: 1926-1932, 1987.
- REINER, N.E. Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. **Immunol. Today**, **15**:374-381, 1994.
- REMALEY, A.T.; GLEW, R.H.; KUHNS, D.B.; BASFORD, R.E.; WAGGONER, A.S.; ERNST, L.A.; POPE, M. *Leishmania donovani*: surface membrane acid phosphatase blocks neutrophil oxidative metabolite production. **Exp. Parasitol.**, **60**: 331-341, 1985.
- RODRIGUES, J.C.; ATTIAS, M.; RODRIGUEZ, C.; URBINA, J.A.; DE SOUZA, W. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22, 26-azasterol, a delta(24(25))-Sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **46**: 487-499, 2002.
- ROSS, R. Platelet derived growth factor. **Lancet** **1**: 1179-1181, 1989.

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

SACKS, D.L.; PERKINS, P.V. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **34**: 456-459, 1985.

SACKS, D.L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Exp. Parasitol.**, **69**: 100-103, 1989.

SACKS, D.L.; SARAIVA, E.M.; ROWTON, E.; TURCO, S.J.; PIMENTA, P.F. The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. **Parasitology**. **108**: 55-62, 1994.

SACKS DL, MODI G, ROWTON E, SPATH G, EPSTEIN L, TURCO SJ, BEVERLEY SM. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **97**: 406-411, 2000.

SALVI M, BRUNATI AM, CLARI G, TONINELLO A. 2002. Interaction of genistein with the mitochondrial electron transport chain results in opening of the membrane transition pore. **Biochim Biophys Acta** 1556: 187-196

SARAIVA, E.M.; PIMENTA, P.F.; BRODIN, T.N.; ROWTON, E.; MODI, G.B.; SACKS, D.L. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. **Parasitology**, **111**: 275-287, 1995.

SCHLEIN, Y. *Leishmania* and sandflies interactions in the life cycle and transmission.

Parasitol. Today, 9: 255-258, 1993.

SCHNEIDER, A. Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids. **Int. J.**

Parasitol., 31: 1403-1415, 2001.

SHAPIRA, M.; MCEWEN, J.G.; JAFFE, C.L. Temperature effects on molecular processes

which lead to stage differentiation in *Leishmania*. **EMBO J.**, 7: 2895-2301, 1988.

SHIR A, FRIEDRICH I, LEVITZKI A. Tumor specific activation of PKR as a non-toxic

modality of cancer treatment. **Semin Cancer Biol.**, 13: 309-314, 2003.

SINGH, S.; DEY, A.; SIVAKUMAR, R. Applications of molecular methods for *Leishmania*

control. **Expert Rev. Mol. Diagn.**, 5: 251-265, 2005.

SINGH, N.; CURRAN, M.D.; MIDDLETON, D.; RASTOGI, A.K. Characterization of

kinetoplast DNA minicircles of an Indian isolate of *Leishmania donovani*. **Acta trop.** 73:

313-319, 1999.

SINGLA, N.; KHULLER, G.K.; VINAYAK, V.K. Acid phosphatase activity of

promastigotes of *Leishmania donovani*: a marker of virulence. **FEMS Microbiol. Lett.**, 15:

221-225, 1992.

SOARES, M.B.P.; TITUS, R.G.; SHOEMAKER, C.B.; DAVID, J.R.; BOZZA, M. The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. **J. Immunol.**, **160**: 1811-1816, 1998.

SPICER, J, HARPER, P. Targeted therapies for non-small cell lung cancer. **Int. J. Clin. Pract.**, **59**:1055-1062, 2005.

SUTTERWALA, F. S.; NOEL, G. L.; CLYNES, R.; MOSSER, D. M. Selective suppression of interleucine-12 induction after macrophage receptor ligation. **J. Exp. Med.** **185**: 1977-1985, 1997.

SYMMERS, W.S.C. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. **Lancet** **16**: 127-132, 1960.

TAMAOKI, T. Use and specificity of staurosporine, UCN-01 and calphostine C as protein kinase inhibitors. **Meth. Enzymol.**, **201**: 340-347, 1991.

TAMAOKI, T.; NAKANO, H. Potent and specific inhibitors of protein kinase C of microbial origin. **Biotechnology**, **8**: 732-735, 1990.

THEODOS, C.M.; TITUS, R.G. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function *in vitro*. **Parasite Immunol.**, **15**: 481-487, 1993.

TOWNBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitocellulose sheets: procedure and some aplications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **76**: 4350-4354, 1979.

TU, X.; WANG, C.C. The Involvement of Two cdc-related Kinases (CRKs) in *Trypanosoma brucei* Cell Cycle Regulation and the Distinctive Stage-specific Phenotypes by CRK3 Depletion. **J. Biol. Chem.**, **19**: 20519-20528, 2004.

TURCO, S.J.; DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglican of *Leishmania* parasites. **Ann. Rev. Microbiol.**, **46**: 65-94, 1992.

UEHARA, Y.; FUKAZAWA, H. Use and selectivity of herbimycin A as inhibitor of protein tytosine kinases. **Meths. Enzymol.**, **201**: 370-379, 1991.

VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **Immunology**, **173**: 6521-6525, 2004.

VANNIER-SANTOS, M.A.; MARTINY, A.; DE SOUZA, W. The biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Curr. Pharm. Design.**, **8**: 297-318, 2002.

VANNIER-SANTOS, M.A.; MARTINY, A.; MEYER-FERNANDES, J.R.; DE SOUZA, W. Leishmanial protein kinase C modulates host cell infection via secreted acid phosphatase. **Eur. J. Cell Biol.**, **67**: 112-119, 1995.

VANNIER-SANTOS, M.A.; PIMENTA, P.F.; DE SOUZA, W. Effects of phorbol ester on *Leishmania mexicana amazonensis*: an ultrastructural and cytochemical study. **J.**

Submicrosc. Cytol. Pathol., **20**: 583-593, 1988.

VANNIER-SANTOS, M.A.; URBINA, J.A.; MARTINY, A.; NEVES, A.; DE SOUZA, W. Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*.

J. Eukaryot. Microbiol., **42**:337-346, 1995.

VANNIER-SANTOS, M.A.; SARAIVA, E.M.; MARTINY, A.; NEVES, A.; DE SOUZA, W. Fibronectin shedding by *Leishmania* may influence the parasite-macrophage interaction.

Eur. J. Cell Biol., **59**: 389-397, 1992.

VASSAR, R.; FUCHS, E. Transgenic mice provide new insights into the role of TGF-alpha during epidermal development and differentiation. **Genes Dev.**, **5**: 714-727, 1991.

VIEIRA, L.L.; SACERDOTI-SIERRA, N.; JAFFE, C.L. Effect of pH and temperature on protein kinase release by *Leishmania donovani*. **Int. J. Parasitol.**, **32**: 1085-1093, 2002.

WAKELING, A.E. Inhibitors of growth factor signalling. **Endocr Relat Cancer** **12**: 183-187, 2005.

WALTON, B.C. 1989. Leishmaniasis: a worldwide problem. **Int. J. Dermatol.**, **28**: 305-307, 1989.

WANDERLEY JL, BENJAMIN A, REAL F, BONOMO A, MOREIRA ME, BARCINSKI MA. Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/*Leishmania* interplay. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **38**: 807-812, 2005.

WHEELER-ALM, E.; SHAPIRO, S.Z. Evidence of tyrosine kinase activity in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*. **J. Parasitol.**, **39**: 413-416, 1992.

WIESE, M. A mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue of *Leishmania mexicana* is essential for parasite survival in the infected host. **EMBO J.**, **17**: 2619-2628, 1998.

WIESE, M.; KUHN, D.; GRUNFELDER, C.G. Protein kinase involved in flagellar-length control. *Eukaryot. Cell*, **2**: 769-777, 2003a.

WIESE, M.; WANG, Q.; GORCKE, I. Identification of mitogen-activated protein kinase homologue from *Leishmania mexicana*. **Int. J. Parasitol** **33**: 1577-1587, 2003b.

WILSON, E.; OLCOTT, M.C.; BELL, R.M.; MERRILL JUNIOR, A.H.; LAMBETH, .JD. Inhibition of the oxidative burst in human neutrophils by sphingoid long-chain bases. Role of protein kinase C in activation of the burst. **J. Biol. Chem.**, **261**: 12616-12623, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Division of control of tropical diseases. Leishmaniasis control home page. Disponível em <<http://www.who.int/health-topics/leishmaniasis.html>> (updated 2000).

ZILBERSTEIN, D.; BLUMENFELD, N.; LIVEANU, V.; GEPSTEIN, A.; JAFFE, C.L.

Growth at acidic pH induces an amastigote stage-specific protein in *Leishmania* promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.** **45**: 175-178, 1991.

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Ann. Rev. Microbiol.**, **48**: 449-70, 1994.

ZULUAGA, M.; ROBLEDO, S.M. Role of Langerhans cells in the immunity of leishmaniasis. **Biomedica.** **24**: 302-317, 2004.