



**Nuno Pedro Moreira
Santarém**

**Captação de ferro por amastigotas de *Leishmania
infantum***



**Nuno Pedro Moreira
Santarém**

**Captação de ferro por amastigotas de *Leishmania
infantum***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica da Prof. Doutora Ana Maria Luís Ramos Tomás, Professora Associada do Instituto de Biomédicas Abel Salazar e a Prof. Doutora Anabela Cordeiro-da-Silva, Professora Associada com agregação do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Texto Apoio financeiro do POCTI no
âmbito do III Quadro Comunitário de
Apoio:
POCTI/ESP/41082/2001

UA-SD



264855

O júri

presidente

Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos
Professor associado da Universidade de Aveiro

Doutor Vítor Manuel Vieira da Costa
Professor auxiliar do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, da Universidade do Porto

Doutora Ana Maria Ramos Tomás
Professora associada do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, da universidade do Porto

Doutora Anabela Cordeiro da Silva
Professora associada da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

agradecimentos

Agora a parte mais difícil os agradecimentos... São tantos que nem sei por onde começar!!

Obviamente começamos por quem “permitiu” esta tese para com quem tenho já uma dívida impagável, pois mesmo que devolva em trabalho e dedicação tudo que me ofereceram nunca poderei pagar o facto de me terem ensinado a andar no mundo da ciência. Por isso obrigado Doutoradas Ana e Anabela.

Agradeço ainda a todos os que contribuíram directa ou indirectamente para esta tese ao longo destes dois anos... Por uma questão de respeito não irei dizer nomes pois correria o risco de me esquecer de alguém... No entanto vocês sabem quem são! Não escondo de quem gosto e ao lado de quem me dá prazer trabalhar por isso muito obrigado a todos!

Dedico também esta tese a todos os meus amigos do “tasco” que me mantiveram vivo e socializante...

E agora para terminar gostaria de agradecer a um nível mais pessoal ao Sr. Santarém, à Sra. Margarida, Maria Angelina, Jorge, Família Simões, Pedro Simões e Ana Mota... Todos contribuíram à sua maneira dando-me a estabilidade necessária para levar esta tese a bom porto, por isso muito obrigado por serem como são...

OBRIGADO A TODOS...

palavras-chave

Leishmania, amastigota, ferro, hemoglobina, hemina.

resumo

O ferro é um elemento essencial para quase todos os organismos, a *Leishmania* não é excepção. Pouco é conhecido sobre o metabolismo do ferro em *Leishmania*, especialmente no seu estágio intracelular, o amastigota. Por isso foram estudadas quais as fontes de ferro utilizáveis pela forma amastigota. Usando um meio pobre em ferro foi demonstrado que amastigotas axénicos de *Leishmania infantum* são capazes de adquirir ferro proveniente de diferentes fontes como a hemoglobina, a hemina, ferro associado a quelantes de baixo peso molecular e ferro iónico. Pelo contrário a ferritina, a lactoferrina e a transferrina não permitiram o crescimento parasitário. Foi também iniciado o estudo dos mecanismos de captação de ferro associados às diferentes fontes utilizáveis. Resultados preliminares sugerem a aquisição de ferro a partir da hemina e da hemoglobina mediante receptores específicos ou então, no caso do ferro iónico e do ferro associado a nitrilotioacetato, mediante a acção de reductases

keywords

Leishmania, amastigote, iron, haemoglobin, heme.

abstract

Iron is an essential element for all living systems. *Leishmania* is no exception. Little is known about iron metabolism in *Leishmania*, especially in the mammalian stage (the amastigote). For this reason we have started looking at the process of iron acquisition in amastigotes. Using an iron poor media we demonstrated that *Leishmania infantum* axenic amastigotes are able to acquire iron from different iron sources like haemoglobin, heme and elemental iron either in the form of Fe^{2+} or Fe^{3+} . This suggests a significant flexibility in the acquisition of this metal. In our assays neither ferritin, lactoferrin or transferrin induced significant growth. At present we are dissecting the mechanism of iron internalization from heme and haemoglobin. Preliminary results suggest the uptake through specific receptors. Concerning ionic iron or iron associated with NTA our studies seem to indicate iron uptake through a reductase system.

Índice

Abreviaturas	9
Figuras	10
Tabelas.....	13
Introdução	14
1. Generalidades	14
2. <i>Leishmania</i>	16
2.1. Taxonomia.....	16
2.2. Biologia da <i>Leishmania</i>	17
3. A leishmaniose	19
3.1. A leishmaniose humana	19
3.2. Um caso particular: a leishmaniose canina.....	22
3.3. Diagnóstico da leishmaniose	23
3.4. Tratamento da leishmaniose	25
3.5. Importância do estudo da <i>Leishmania</i> no combate à leishmaniose	26
4. Ferro	26
4.1. Generalidades	26
4.2. Importância biológica do ferro.....	28
4.3. Fontes de ferro disponíveis para organismos patogénicos.....	30
4.4. Principais mecanismos de captura de ferro por microorganismos.....	31
4.5. Captação de ferro pela <i>Leishmania</i>	33
Material e métodos	37
1. Culturas e manutenção dos parasitas	37
2. Contagens	37
3. Incorporação de ferro em transferrina e lactoferrina	37
4. Ensaio de crescimento.....	38
5. Determinação de viabilidades celulares por citometria	38
6. Quantificação do ferro no SBF	39
7. Desenvolvimento do meio alternativo de crescimento dos parasitas	39
8. Controlo do pH de uma cultura de amastigotas	40
9. Redução do ferrocianato por acção de redutores e oxidantes	40
10. Redução do ferrocianato por acção de amastigotas e promastigotas	41
11. Experiências com Fe ⁵⁵	41

12. Captação de Fe ⁵⁵ por amastigotas a 4°C e a 37°C.....	42
13. Captação de Fe ⁵⁵ Cl3 ou Fe ⁵⁵ -NTA na presença de agentes redutores ou oxidantes.....	42
14. Iodinação	43
15. Captação de elementos iodados por amastigotas a 4°C e a 37°C	44
16. Ensaio de competição com hemoglobina iodada	44
17. Ensaio de ligação com hemoglobina iodada para verificar o tempo de saturação	45
18. Ensaio de competição homóloga com hemoglobina iodada.....	45
19. Captação de hemoglobina por amastigotas a 37°C	46
20. Comparação de diferentes temperaturas no processo de lavagem dos amastigotas	46
21. Presença de elementos iodados degradados após o ensaio de captação	46
22. Síntese de hemina	47
23. Captação de Fe ⁵⁵ proveniente da hemina por amastigotas a 4°C e 37°C..	48
24. Ensaio de competição com hemina-Fe ⁵⁵	48
25. Ensaio de ligação com hemina-Fe ⁵⁵ para verificar o tempo de saturação	48
26. Ensaio de ligação com hemina-Fe ⁵⁵	49
27. Captação de hemina-Fe ⁵⁵ a 37°C	49
28. Titulação biológica com dipiridil	50
29. Determinação de condições de starvation utilizando dipiridil	50
Resultados	51
1. Desenvolvimento de um meio para avaliar quais os componentes que podem ser usados como fontes de ferro para as formas amastigotas de <i>L. infantum</i>	51
2. Determinação das fontes de ferro que permitem o crescimento parasitário em meio Fi	55
3. Estudo da captação do ferro por fontes não hémicas.....	58
4. Estudo sobre a captação de hemoglobina pela forma amastigota	61
5. Estudo sobre a captação de hemina pela forma amastigota	67
6. Estudo para a determinação das condições de “starving” de ferro.....	70
Discussão	73
Considerações finais.....	84
Bibliografia.....	85

Abreviaturas

- ADN – Ácidos desoxiribonucleicos
ARN – Ácidos ribonucleicos
BSA – Albumina bovina sérica
CDC – “Center for Disease Control”
DAT – “Direct agglutination test”
DPD – 2-2’ - Dipyridil
ELISA – “Enzyme-linked immunosorbent test”
LC – Leishmaniose cutânea
LMC – Leishmaniose mucocutânea
LV – Leishmaniose visceral
NTA – Nitritotriacetato de sódio
OMS – Organização Mundial de Saúde
SIDA – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
VIH – Vírus de Imunodeficiência Humana

Figuras

1– W. Leishman and C. Donovan.....	15
2 – Comparação entre olaria pré-inca representando um rosto com os traços típicos de leishmaniose (A) e um caso real de leishmaniose na Bolívia (B) ...	16
3 – Mosca da areia fêmea e pormenor de um <i>Phlebotomus sp.</i> Fêmea.....	18
4 – Fotos de microscopia electrónica de <i>Leishmania major</i>	19
5 – Representação esquemática do ciclo de vida da <i>Leishmania</i> , adaptado do CDC (<i>Center for Disease Control</i>)	20
6 – Sinais clínicos associados às diferentes formas de leishmaniose	21
7 – Distribuição mundial da Leishmaniose	22
8 – <i>Leishmune</i> , a 1ª vacina comercial contra a leishmaniose canina.....	26
9 - Tabela periódica	28
10 – BIF ou “Banded Iron Formations”	29
11 – Reacção de Fenton, com a formação de espécies reactivas de oxigénio..	30
12 – Representação esquemática das principais fontes de ferro no Homem .	32
13 – Via biossintética do grupo heme em eucariotas.....	35
14 - Quantidade de ferro presente no soro antes e após a filtração	52
15 – Curvas de crescimento das formas amastigotas a 37°C ao longo do tempo	53
16 - Curvas de crescimento das formas amastigotas a 37°C ao longo do tempo em meio Fi suplementado com hemina e/ou 3% BSA.....	54
17 - Curvas de crescimento das formas amastigotas a 37°C ao longo do tempo, em meio Fi suplementado com hemina, Fe-NTA e/ou protoporfirina	54
18 - Curvas de crescimento das formas amastigotas a 37°C ao longo do tempo em meio Fi suplementado com hemina, Fe-NTA e/ou diferentes quantidades de protoporfirina	55
19 - Curvas de crescimento das formas amastigotas a 37°C ao longo do tempo, em meio Fi suplementado com hemina, Fe-NTA, Fi/NTA e/ou protoporfirina	56
20 - Curvas de crescimento das formas amastigotas a 37°C ao longo do tempo, em meio Fi suplementado com: 8 µM hemina ao longo de três repicagens sequenciais.....	56
21 - Curvas de crescimento das formas amastigotas a 37°C ao longo do tempo, em meio Fi suplementado com diferentes fontes de ferro.....	57

22 – Crescimento ao fim de 5 dias em meio Fi complementado com diferentes quantidade de Fe-NTA (NTA) , FeCl ₃ e hemina (Hmn)	58
23 - Curvas de crescimento das formas amastigotas a 37°C ao longo do tempo, em meio Fi suplementado com diferentes formas de transferrina.....	58
24 – Controlo do pH de uma cultura de formas amastigotas a 37°C ao longo do tempo, em meio MAA20	59
25 - Captação relativa de Fe ⁵⁵ proveniente do complexo Fe ⁵⁵ -NTA após incubação de 3x10 ⁷ amastigotas/mL em MAA, na presença de 0,74 µM de Fe ⁵⁵ -NTA, a 4°C e a 37°C	60
26 – Redução do ferrocianato de potássio em MAA por intermédio da acção de redutores ou oxidantes, determinada pela variação da absorção a 420 nm60	
27 – Redução do ferrocianato de potássio por acção das formas amastigotas (Δ A) ou promastigotas (Δ P)	61
28 - Captação de Fe ⁵⁵ , proveniente de FeCl ₃ ou Fe-NTA, pelas formas amastigotas ao fim de 3 horas de incubação em meio MAA	61
29 –Imagem resultante da exposição de um gel de SDS carregado com 2 µL das quatro melhores fracções obtidas durante a iodinação da hemoglobina.	62
30 – Captação de elementos iodinados pelas formas amastigotas ao fim de 3 horas de cultura em MAA, a a 4°C e a 37°C na presença de quantidades crescentes de hemoglobina iodinada.....	63
31 - Ligação de elementos iodinados pelas formas amastigotas ao fim de 4 horas a 4°C num ensaio de competição.....	63
32 – Ligação de 50 nM de hemoglobina iodinada ao parasita em função do tempo a 4°C	64
33 – Ligação de 50 nM de hemoglobina iodinada ao parasita em função do tempo após 3 horas de incubação a 4°C na presença de quantidades crescentes de hemoglobina fria.....	65
34 - Ligação de 50 nM de hemoglobina iodinada ao parasita, ao fim de 3 horas a 4°C, na presença de quantidades crescentes de hemoglobina fria.....	65
35 – Captação de elementos iodinados pelas formas amastigotas a 37°C durante 3 horas de incubação com quantidades crescentes de hemoglobina iodinada. As duas rectas distintas marcam os dois padrões da captação detectados	66
36 – Captação de elementos iodinados pelas formas amastigotas incubadas durante 3 horas a 37°C na presença de 50 nM de hemoglobina iodinada.....	67
37 – Presença de elementos iodinados provenientes da degradação da hemoglobina pelas formas amastigotas no meio ao fim de 3 horas de	

incubação com 100 nM de hemoglobina iodada a 37°C e 4°C.....	67
38 – (I) TLC confirmando a síntese de hemina e (II) Exposição da placa de TLC sob um filme revelando a incorporação de Fe ⁵⁵ no grupo heme.....	68
39 – Captação de Fe ⁵⁵ pelas formas amastigotas ao fim de 3 horas de cultura, em MAA, a 4°C e 37°C na presença de quantidades crescentes de hemina-Fe ⁵⁵	69
40 – Ligação de Fe ⁵⁵ proveniente da hemina às formas amastigotas ao fim de 3 horas a 4°C num ensaio de competição.....	69
41 - Ligação de 50 nM de hemina-Fe ⁵⁵ ao parasita em função do tempo a 4°C.....	70
42 - Ligação de quantidades crescentes de hemina-Fe ⁵⁵ ao parasita, ao fim de 3 horas a 4°C	70
43 – Captação de Fe ⁵⁵ pelo parasita após incubação durante 3 horas a 37°C, com quantidades crescentes de hemina-Fe ⁵⁵	71
44 – Número de formas amastigotas em cultura após 48 horas de incubação a 37°C, com quantidades crescentes de dipiridil (DPD), em MAA20	72
45 - Captação de Fe ⁵⁵ após incubação de parasitas a 37°C com diferentes concentrações de DPD durante 5 horas e 24 horas.....	73
46 – Diagrama de Pourbaix simplificado	80

Tabelas

1 – Classificação taxonómica do género <i>Leishmania</i>.....	17
--	-----------

Introdução

1. Generalidades

Em 1901 William Boog Leishman (Figura 1), um patologista escocês, identificou certos corpos ovais em esfregaços de um baço proveniente de um paciente que tinha morrido de *kala azar*. A doença era caracterizada por debilidade geral, episódios febris, anemia severa, atrofia muscular e esplenomegalia. De início estes organismos descobertos por Leishman foram identificados como tripanossomas. Independentemente, em 1903, Charles Donovan descreveu-os como novos organismos. A ligação entre estes organismos e a patologia a eles associada foi efectuada por Ross que chamou aos organismos *Leishmania donovani*. Assim, foi descoberto o género *Leishmania* (Organização Mundial da Saúde - OMS).



Fig. 1 – W. Leishman and C. Donovan (Adaptado de <http://leishman.cent.gla.ac.uk/william.htm>)

Desde então o género *Leishmania* é associado, á indução de um espectro de doenças descritas como Leishmanioses ou Leishmaníases. A leishmaniose é caracterizada por manifestações clínicas muito variadas, desde úlceras cutâneas que se curam espontaneamente a manifestações visceralizantes mortais.

A leishmaniose não é uma infecção recente, casos clínicos estão descritos ao longo

da história da humanidade. As referências mais antigas associadas com a leishmaniose estão impressas em tábuas de argila encontradas na biblioteca de Assurbanipal (Rei da Assíria) datando do século quinto antes de Cristo. Notavelmente alguns desses textos parecem ser transcrições de outros textos escritos entre 1500 e 2500 a.C. [1]. Dos séculos subsequentes apenas se encontram referências conotadas com a leishmaniose em textos de médicos árabes e persas, entre os quais os mais notáveis são de Avicenna, século 10 d.C. O primeiro caso descrito por um médico ocidental foi, muito possivelmente, em 1824, quando médicos britânicos referenciaram, em Jessore na Índia, casos de pacientes, supostamente infectados com malária, que não respondiam à terapia com quinino [1]. No velho mundo, os indícios mais antigos de leishmaniose foram encontradas em olaria pré-Inca, com representações de lesões cutâneas e deformações faciais associadas à leishmaniose datando do primeiro século d.C. (Figura 2). Nos séculos da colonização espanhola das Américas aparece o termo de “Lepra Branca” para descrever as lesões desfigurantes associadas à leishmaniose. No Velho Mundo médicos indianos utilizavam o termo Sancrito *kala azar* (“Febre negra”) para uma doença antiga mais tarde identificada como leishmaniose.

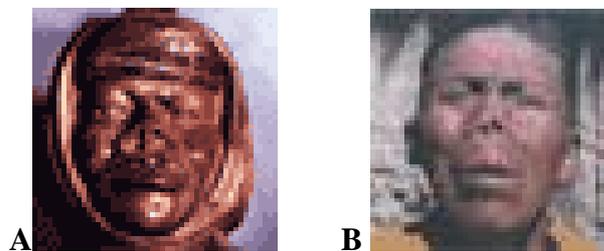


Fig. 2 – Comparação entre olaria pré-inca representando um rosto com os traços típicos de leishmaniose (A) e um caso real de leishmaniose na Bolívia (B) (Adaptado de <http://www.who.int>)

Apenas no século XX, após 1903, foram feitos avanços significativos no estudo da leishmaniose. Em 1920 foi identificado o *Phlebotomus*, conhecido normalmente como mosca da areia, como o vector de transmissão da infecção. Foi também nos anos 20 que foram utilizados pela primeira vez derivados de antimônio no tratamento da leishmaniose (ainda hoje são utilizados). Actualmente o estudo da *Leishmania* não se limita ao combate da leishmaniose pois o próprio organismo, a *Leishmania*, tem vindo a ser usada como

modelo para estudos de biologia básica. A descoberta de âncoras de GPI para proteínas de membrana, a edição trans do ARN e diversos estudos sobre a divisão dos linfócitos T em duas subpopulações Th1 e Th2 foram algumas das descobertas importantes associadas a estes organismos. Entretanto acredita-se que a sequenciação do genoma de espécies de *Leishmania* como a *Leishmania major* (2004), a *Leishmania infantum* (2005), estando actualmente a decorrer a sequenciação da *Leishmania braziliensis*, torne possível compreender ainda melhor estes organismos abrindo portas para novas perspectivas de combate à leishmaniose.

A leishmaniose continua um problema de saúde grave descrito pela OMS como uma doença reemergente não controlada.

2. *Leishmania*

2.1. Taxonomia

Os protozoários da classe dos *Kinetoplastidea*, da qual faz parte o género *Leishmania* (Tabela 1), são protozoários ancestrais caracterizados por possuírem uma única mitocôndria, no interior da qual o ADN mitocondrial está condensado numa zona designada por cinetoplasto. Filogeneticamente são dos eucariotas mais antigos, juntamente com a ordem dos *Euglenoidea*, possuindo apenas, como já foi referido, uma mitocôndria funcional.

Tabela 1 – Classificação taxonómica do género *Leishmania*.

Reino	<i>Protista</i>
Filo	<i>Euglenozoa</i>
Classe	<i>Kinetoplastidea</i>
Ordem	<i>Trypanosomatida</i>
Género	<i>Leishmania</i>

O modo de desenvolvimento do parasita dentro do, insecto, ainda permite dividir o

gênero *Leishmania* em dois subgêneros: O subgênero *Leishmania* cujos parasitas são caracterizados por um desenvolvimento suprapilórico, a montante da junção entre o intestino médio e o intestino superior, e o subgênero *Vianna* em que ocorre um crescimento peripilórico, desenvolvendo-se os parasitas quer no intestino inferior quer no médio.

2.2. Biologia da *Leishmania*

Leishmania é um parasita protozoário dimórfico que infecta vários vertebrados como humanos, cães e roedores. O ciclo de vida dos membros deste gênero envolve um hospedeiro vertebrado e fêmeas de dípteros hematófagos, da família *Phlebotomidae*, que transmite o parasita entre os hospedeiros vertebrados. Os flebotomídeos, (Figura 3) existem em áreas de clima temperado, como acontece na maioria dos países mediterrânicos, aparecendo apenas durante a estação quente, entre Maio e Outubro, uma vez que preferem temperaturas entre 15 e 20 °C. Os vectores de *Leishmania* são distintos no Novo e Velho-Mundo, flebotomídeos do género *Lutzomyia* e *Phlebotomus* respectivamente.

A



B



Fig. 3 – (A) Mosca da areia fêmea durante uma refeição, de notar as reduzidas dimensões do insecto, 5-6 mm (Adaptado de Wikipedia). (B) Pormenor de um *Phlebotomus* sp. Fêmea (Adaptado de <http://www.who.int>).

A *Leishmania* é um organismo dimórfico podendo assumir durante o seu ciclo de vida duas formas principais: promastigota e a amastigota. As formas promastigotas (Figura 3A) são organismos flagelados, longos e fusiformes que medem 10 a 25 μ m de

comprimento e que se multiplicam activamente por divisão binária no intestino do vector. No hospedeiro vertebrado o parasita transforma-se na forma amastigota (Figura 4B e C), arredondada ou ovóide de 1,5 a 5 μm que apresenta um núcleo relativamente grande, localizado excentricamente. Estas formas encontram-se nos fagolisossomas dos macrófagos de mamíferos infectados estando por isso adaptadas à temperatura corporal dos hospedeiros e ao meio ácido dos fagolisossomas.

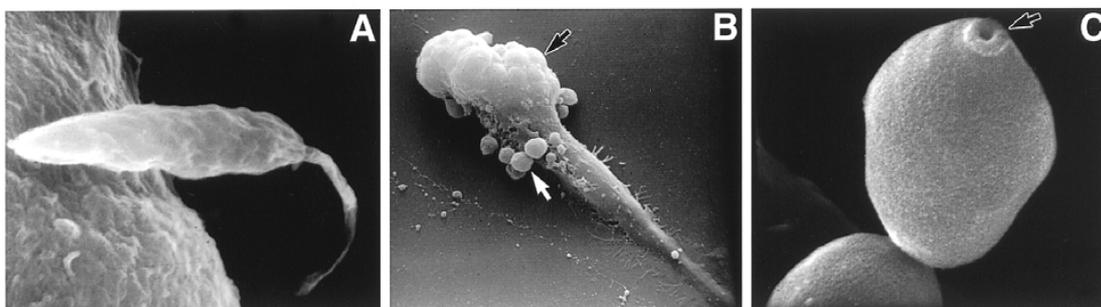


Fig. 4 – Fotos de microscopia electrónica de *Leishmania major*, forma promastigota na superfície de um macrófago (A), um macrófago com amastigotas à superfície (B), e amastigota extracelular com destaque para o flagelo vestigial (C) Adaptado de Roberts *et al* [2].

O ciclo de vida (Figura 5) começa quando uma mosca da areia fêmea infectada se alimenta num mamífero. À medida que a mosca de areia se alimenta, as formas promastigotas do parasita entram no mamífero via probóscide. Dentro do mamífero, as formas promastigotas ligam-se aos macrófagos e células dendríticas através de diversos receptores celulares (receptor Fc, receptor para a manose e factores do complemento, por exemplo C3b). A interacção com o complemento permite a entrada do parasita para o interior da célula. O componente 3b do complemento (C3b) liga-se à superfície das formas promastigotas, que são conseqüentemente fagocitadas e envolvidas num vacúolo parasitóforo que se funde com o lisossoma (fagolisossoma). Os parasitas sobrevivem aos sistemas microbicidas intramacrofágicos (produtos de metabolismo do oxigénio, hidrolases dos lisossomas, baixo pH e proteínas catiónicas) e convertem-se em formas amastigotas no interior dos macrófagos. As formas amastigotas multiplicam-se e por ruptura do fagolisossoma infectam outros fagócitos mononucleares. A forma amastigota sobrevive no ambiente ácido do fagolisossoma a um pH celular próximo dos 5,5 [3, 4].

O hospedeiro infectado é picado por outra mosca da areia e os macrófagos com parasitas são recolhidos enquanto o insecto se alimenta. As formas amastigotas dos parasitas transformam-se em promastigotas dentro da mosca e após 4 a 7 dias os parasitas encontram-se na fase infectante – promastigotas metacíclicos - prontos a serem introduzidos noutra hospedeiro.

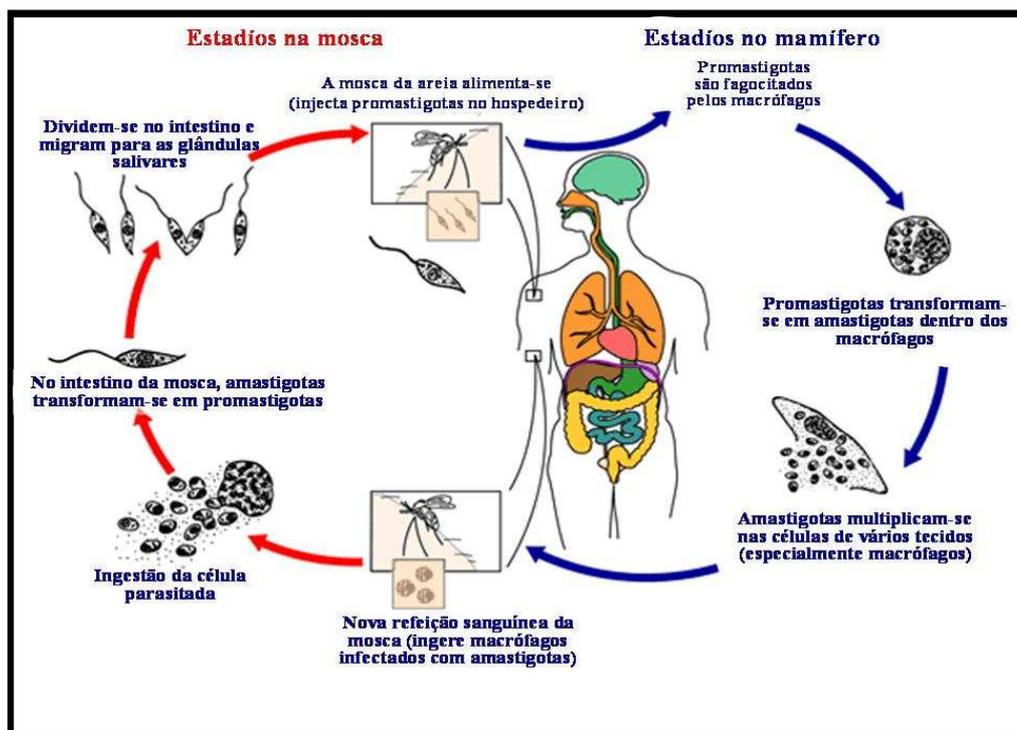


Fig. 5 – Representação esquemática do ciclo de vida da *Leishmania*, adaptado do CDC (Center for Disease Control).

3. A leishmaniose

3.1. A leishmaniose humana

A leishmaniose é considerada a segunda doença protozoária mais importante do mundo, sendo a sua incidência apenas mais baixa do que a malária. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses são actualmente endémicas em 88 países, em cinco continentes, afectando 12 milhões de pessoas e estando 350 milhões

em risco. Dos 1,5-2 milhões de casos que ocorrem anualmente, apenas 600 000 são declarados oficialmente [5].

A leishmaniose está presente no Homem sob três formas distintas, com um largo leque de manifestações clínicas (Figura 6):

- Leishmaniose visceral (LV) também conhecida como *kala azar*, é a forma mais severa desta doença, a qual, se não tratada, tem um grau de mortalidade de quase 100 %. É caracterizada por surtos de febre irregulares, perda substancial de peso, hepatoesplenomegalia e anemia. Noventa por cento dos novos casos que surgem anualmente ocorrem em cinco países: Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão.
- Leishmaniose mucocutânea (LMC), ou *espundia*, produz lesões que podem levar à destruição das membranas mucosas do nariz, boca e garganta, originando lesões extensas e desfigurantes. Noventa por cento do total dos casos ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru.
- Leishmaniose cutânea (LC) origina um grande número de úlceras na pele, em zonas do corpo expostas tais como a cara, as pernas e os braços, sendo fonte de morbidez e deixando cicatrizes permanentes. Normalmente a cura nesta forma de leishmaniose é espontânea. Outro tipo de LC, designado por leishmaniose cutânea difusa (LCD), nunca cura espontaneamente e é susceptível de recaídas após tratamento. As formas cutâneas de leishmaniose são as mais comuns, representando 50 a 75 % de todos os novos casos. Noventa por cento do total dos casos ocorre no Afeganistão, Brasil, Irão, Peru, Arábia Saudita e Síria.

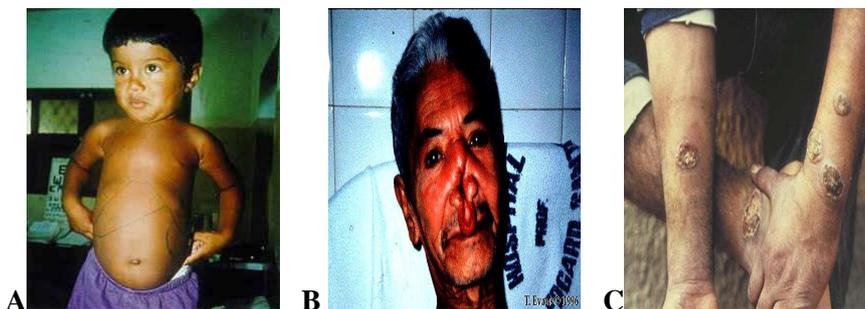


Fig. 6 – Sinais clínicos associados às diferentes formas de leishmaniose: hepatoesplenomegalia associada a leishmaniose visceral (A); lesões nas mucosas associadas à leishmaniose mucocutânea (B) e lesões superficiais associadas à leishmaniose cutânea (C) (Adaptado de <http://www.who.int>).

Cerca de 21 das 30 espécies conhecidas de *Leishmania* são patogénicas para o Homem. Entre as espécies patogénicas incluem-se as do complexo *Leishmania donovani* com três espécies (*Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, e *Leishmania chagasi*); as do complexo *Leishmania mexicana* com três espécies principais (*Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania venezuelensis*); *Leishmania tropica*; *Leishmania major*; *Leishmania aethiopica* e o subgénero *Viannia* com quatro espécies principais (*Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania panamensis* e *Leishmania peruviana*). As diferentes espécies são morfologicamente indistinguíveis podendo ser diferenciadas por análise genética ou imunológica. A distribuição geográfica da leishmaniose (Figura 7) está limitada pela distribuição do seu vector, a mosca da areia.

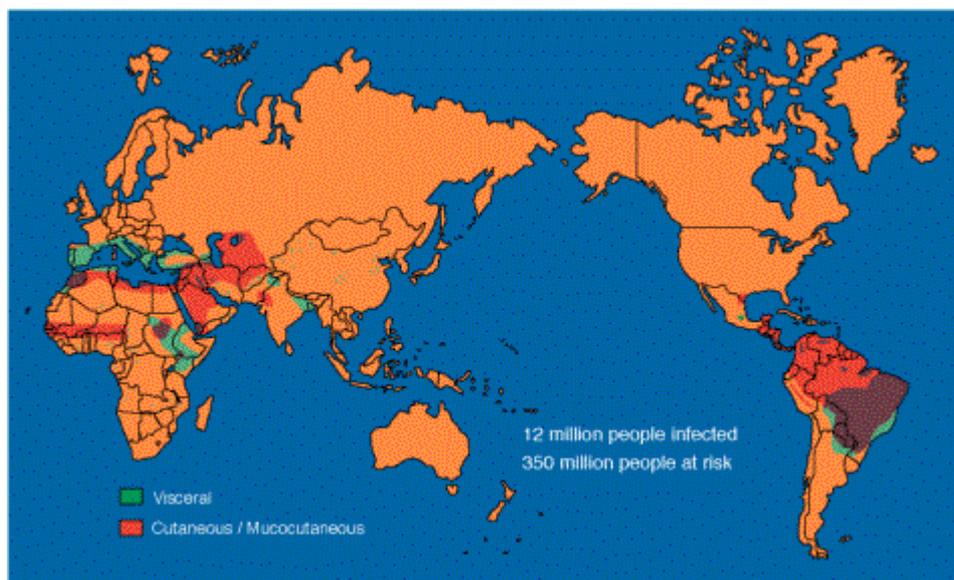


Fig. 7 – Distribuição mundial da Leishmaniose (Adaptado de <http://www.the-travel-doctor.com/leishmaniasis.htm>).

Em Portugal a variante da doença que existe é a leishmaniose visceral provocada por *L. infantum*, comum a toda a bacia do mediterrâneo. É mais frequente em regiões como Trás-os-Montes, Beira Litoral, Algarve e na região dos estuários dos rios Sado e Tejo [6].

A incidência de leishmaniose a nível mundial tem vindo a aumentar, sendo caracterizada pela OMS como uma doença emergente, devido a múltiplos factores, entre os quais a co-infecção com o VIH, o aumento do tráfego internacional, a dificuldade em

controlar os vectores, os conflitos internacionais e o desenvolvimento de resistências à quimioterapia [5].

Relativamente à co-infecção com VIH é de realçar que este fenómeno está a alterar a epidemiologia da doença, trazendo a leishmaniose para novas áreas geográficas. As duas infecções parecem existir numa perigosa sinergia, já que em pessoas com VIH a leishmaniose acelera o despoletar da SIDA (Síndrome de Imunodeficiência Adquirida) devido a um fenómeno de imunossupressão cumulativa. Além disso, a relevância epidemiológica de indivíduos assintomáticos portadores de leishmaniose foi amplificada pois estes indivíduos mediante uma infecção por VIH, rapidamente adquirem leishmaniose. Na Europa do sul, cerca de 70 % de todos os novos casos de leishmaniose visceral estão associados à co-infecção com VIH [7].

3.2. Um caso em particular: A leishmaniose canina

A leishmaniose no cão (*Canis familiaris*) foi descrita em 1908, na Tunísia, por Nicole e Comte. Em Portugal, a doença é conhecida desde 1911 [6].

Em quase todos os países onde a leishmaniose visceral humana é endémica existe, pelo menos, uma espécie animal reservatório de *Leishmania*. Segundo a OMS os cães são o principal reservatório de *L. infantum*, em países da Europa do sul, do Médio Oriente, da Ásia e do norte de África e de *L. chagasi*, em países da América central e do sul.

Os cães são considerados importantes reservatórios de *Leishmania* pois sofrem infecções crónicas pelo parasita. As suas lesões estão de uma maneira geral localizadas à superfície e além disso são animais de contacto próximo com o homem. No Mediterrâneo, a presença de cães domésticos e vadios infectados contribui de uma forma significativa para a manutenção a longo prazo da leishmaniose visceral humana. A leishmaniose canina constitui assim um problema médico veterinário e humano. Segundo estimativas recentes cerca de 2.5 milhões a 15 milhões de cães podem estar infectados nos países do sudoeste da Europa [8].

Em Portugal a leishmaniose visceral é endémica, constituindo uma zoonose na qual o cão é o reservatório principal.

3.3. Diagnóstico da leishmaniose

“Demonstration of the parasite is considered the diagnostic criterion “per excellence” and is a requisite for evaluation of treatment in any of the parasitic diseases”

WHO – Control of leishmaniasis 1990, technical report

O diagnóstico de leishmaniose é dificultado devido à grande variedade de sinais clínicos altamente inespecíficos. Na leishmaniose cutânea a resposta celular está exacerbada e a humoral diminuída, ao contrário do que acontece na visceral. A leishmaniose mucocutânea, em termos de resposta celular está localizada entre ambas. Assim, a escolha de uma técnica apropriada é fundamental para um diagnóstico preciso. Um historial clínico sólido e a obtenção de dados epidemiológicos são auxiliares fundamentais para o processo de diagnóstico.

A detecção de parasitas em esfregaços de tecido proveniente da medula, do baço ou dos nódulos linfáticos permanece o método disponível mais específico para o diagnóstico da leishmaniose. O baço e a medula são superiores em termos de potencial de diagnóstico, relativamente aos nódulos linfáticos, porém obrigam à realização de biopsias invasivas. A obtenção de aspirados destes órgãos para cultura directa dos parasitas, não é compatível com o diagnóstico de rotina e é impossível de efectuar em indivíduos debilitados (co-infecção com VIH) ou com perturbações hematológicas, porém, continua a ser o método mais sensível.

Testes serológicos baseados na detecção de uma resposta humoral específica são comumente utilizados. Durante a fase aguda da LV, aparece uma forte resposta humoral, com marcada hipergamaglobulinémia e a presença de anticorpos antiparasitários específicos e não específicos como consequência de uma activação policlonal de células B. As técnicas de diagnóstico serológico detectam a presença de anticorpos específicos, anti-*Leishmania*.

Ao longo dos anos foi desenvolvida uma grande quantidade de técnicas serológicas. Os métodos serológicos são procedimentos simples, não invasivos, particularmente úteis no diagnóstico de LV, LMC, e LCD. No diagnóstico de LC não são muito indicados, pois

apenas se estabelece uma resposta imunológica do tipo humoral fraca.

Nas técnicas usadas, as imunoglobulinas detectadas são sobretudo da classe IgG, pois são estas que estão associadas a uma resposta secundária. As imunoglobulinas da classe IgM estão associadas a uma resposta primária podendo ser úteis na detecção de processos subclínicos activos de eliminação do parasita. A detecção de IgE está descrita como um bom indicador de leishmaniose visceral activa.

Entre os testes mais utilizados estão a imunofluorescência indirecta, o teste de aglutinação directa (normalmente conhecido como DAT), ELISA e o rK39 “dipstick test” (teste de campo serológico de referencia da OMS). Todos estes testes serológicos, à excepção do último, requerem pessoal e condições que dificultam o seu uso no campo. Os testes serológicos são obviamente falíveis pois a positividade de um determinado teste não reflecte um estado patológico mas sim contacto com o agente infeccioso e resposta humoral subsequente. É possível os testes serológicos permanecerem positivos, por algum tempo, após tratamento ou simplesmente não funcionarem, como é o caso de indivíduos imunodeprimidos (co-infecção com HIV).

Mais recentemente o diagnóstico molecular tem tido uma utilidade crescente na detecção de leishmaniose, permitindo o acompanhamento dos pacientes antes e após tratamento. Estas técnicas são normalmente muito sensíveis e altamente específicas, porém nem sempre estão disponíveis para diagnóstico de rotina.

Uma vez que o cão é considerado o principal reservatório de *Leishmania*, constituindo uma fonte de transmissão da doença para os humanos, nalguns países, os cães considerados positivos (através de métodos parasitológicos e serológicos) são abatidos como medida de controlo. Na China e no Brasil onde se procedeu à eliminação de cães em áreas endémicas, verificou-se uma diminuição da incidência da doença no homem [9, 10] No entanto, para além dos donos dos cães oferecerem resistência a esta prática, a sua eficácia é questionável, pois no Brasil após uma diminuição inicial no número de casos, a incidência voltou a aumentar [10].

É necessário um método de diagnóstico rápido e preciso de leishmaniose, de modo a prevenir a transmissão e a iniciar o tratamento o mais rapidamente possível, evitando medidas drásticas de controlo.

3.4. Tratamento da leishmaniose

A leishmaniose, nomeadamente a sua variante visceral, é invariavelmente mortal se não for tratada. Durante muito tempo o tratamento da leishmaniose foi baseado no uso de derivados de antimónio pentavalentes tais como o Pentostam ou o Glucantime administrados por via intramuscular ou intradérmica durante um mês. Descoberto há 6 décadas o Pentostam (Stibogluconato de sódio) permanece como o tratamento de primeira linha para a leishmaniose apesar da sua cardiotoxicidade em alguns pacientes. Embora seja ainda eficaz na maior parte dos países endémicos, com eficiências de cura de 95%, têm surgido resistências. Em Bihar no norte da Índia existe um fenómeno de resistência que atinge 65% dos casos registados. Drogas de segunda linha como Anfotericina B e o Miltefosine estão também disponíveis comercialmente, porém possuem também problemas relacionados com a toxicidade, alto preço ou dificuldade de administração.

Actualmente a droga mais promissora talvez seja a Paromomicina, um antibiótico com actividade anti-*Leishmania*. Estudos preliminares no Quênia [11] e na Índia [12] demonstraram a sua efectividade.

Relativamente a vacinas, em geral as vacinas de primeira geração, por muito promissoras que tenham sido os testes em modelos animais como o ratinho e o cão, tiveram resultados desapontantes no Homem. Assim a esperança recai sobre as vacinas de segunda geração (moléculas recombinantes, vacinas com organismos atenuados, vacinas de DNA...). Esta segunda geração está ainda em desenvolvimento. Assim, não existe de momento qualquer vacina contra a leishmaniose na sua variante humana. Na sua variante canina existe uma vacina desenvolvida no Brasil, *Leishmune* (Figura 8) que passou a fase de testes, porém não é de aceitação geral, não sendo indicada para a leishmaniose humana.



Fig. 8 – *Leishmune*, a 1ª vacina comercial contra a leishmaniose canina.

3.5. Importância do estudo da *Leishmania* no combate à leishmaniose

O desenvolvimento de terapias/vacinas surge então como um objectivo a longo prazo no combate à leishmaniose. Acredita-se que o conhecimento profundo da biologia do parasita permitirá encontrar novas alternativas terapêuticas bem como o desenvolvimento de uma possível vacina.

Neste âmbito o estudo da captação do ferro pelo parasita surge naturalmente como um alvo interessante pois o ferro é um elemento essencial para o crescimento de quase todos os microorganismos e a *Leishmania* não é excepção. A capacidade de adquirir o ferro por um organismo patogénico é um passo chave no desenvolvimento de qualquer infecção porque um organismo que não cresce ou que cresce com dificuldade é mais facilmente eliminado pelas defesas naturais do hospedeiro. Assim, uma eficiente aquisição de ferro será provavelmente um dos principais determinantes da patogenicidade de qualquer microorganismo. Neste sentido, o conhecimento adquirido pelo estudo do metabolismo do ferro pela *Leishmania*, nomeadamente na sua forma intracelular, a amastigota, poderá servir de base a novas abordagens terapêuticas/vacinas no combate à leishmaniose.

4. O ferro

4.1. Generalidades

O ferro é um metal de transição, pertencente ao grupo 8B da tabela periódica (Figura 8). O ferro é o elemento final da nucleosíntese estelar, sendo por isso muito estável, é o elemento mais pesado que não requer a formação de uma supernova ou outro evento cataclísmico para se formar. É portanto um dos elementos mais abundantes do Universo. Alguns modelos cosmológicos com um universo aberto prevêm que, eventualmente, como resultado da lenta fusão e fissão de todo o material estelar tudo terminará em ferro.

TABELA PERIÓDICA DOS ELEMENTOS

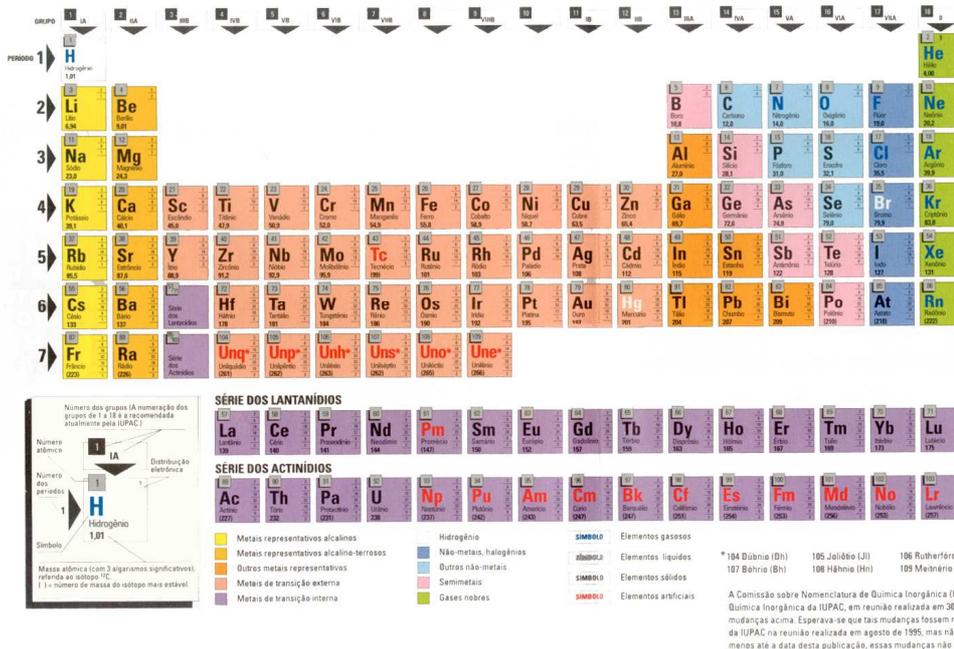


Fig. 9 1- Tabela periódica.

Na Terra o ferro é o segundo elemento mais abundante, à superfície perfaz cerca de 5 % da crosta terrestre sendo o quinto elemento mais comum. É encontrado normalmente na forma de óxidos ou então associado a metais como a hematite, a taconite e a magnetite, porém, em virtude de ser um dos metais menos reactivos, é possível encontrar ferro puro na Natureza. Como todos os metais de transição, o ferro possui características redox muito específicas, assume quatro estados de oxidação +2,+3,+4,+6, sendo o estado +3 o mais comumente encontrado em virtude da nossa atmosfera oxidante. No entanto nem sempre foi assim. A atmosfera primitiva da Terra era muito provavelmente redutora e o ferro existia livremente na forma Fe^{2+} . Este facto é provado pela existência de bandas férreas características (Figura 10) em sedimentos marinhos com mais de 2,5 milhões de anos. Só com o aumento da concentração de O_2 na atmosfera e a passagem de uma atmosfera redutora a uma oxidante é que se passou a ter o Fe^{3+} como o estado de oxidação normal do ferro.

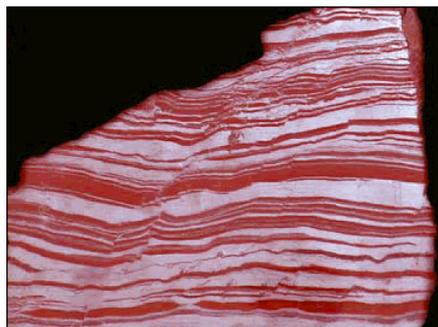


Fig. 10 – BIF ou “Banded Iron Formations” são formações características encontradas em sedimentos marinhos com 1,8 a 2,5 bilhões de anos. As BIF são resultantes da precipitação do ferro livre por acção do oxigénio produzido pelos primeiros organismos fotossintéticos.

Como resultado da passagem de uma atmosfera redutora para uma oxidante, a biodisponibilidade do ferro foi completamente alterada. A pH 7 o produto de solubilidade para o $\text{Fe}(\text{OH})_3$ é 10^{-38}M , sendo a concentração teórica de ferro biodisponível de 10^{-17}M . No entanto há que ter em conta a formação de complexos aqua/hidroxo férricos que contribuem para que a solubilidade real seja um pouco mais elevada, na ordem dos 10^{-9}M , ainda assim muito inferior aos 10^{-7}M requerida pela maior parte dos organismos [13]. Para resolver este problema os organismos desenvolveram inúmeros processos para solubilizar o ferro, associando-o a proteínas (nos organismos superiores existe uma proteína altamente conservada, a transferrina, que é utilizada para captar o ferro extracelular) ou a outros quelantes, como pequenos péptidos com grande afinidade para o ferro e derivados de ésteres, colectivamente conhecidos como sideróforos.

4.2. Importância biológica do ferro

Devido às suas características únicas, diferentes estados de oxidação e ubiquidade, o ferro é um cofactor essencial de inúmeras enzimas: citocromos, catalases, peroxidases, proteínas com centros de ferro-enxofre, oxigenases e todas as nitrogenases, estando por isso envolvido numa miríade de processos biológicos como metabolismo de energia, transporte de oxigénio, síntese de ADN e ARN e na detoxificação de oxidantes, para citar apenas os mais importantes. No entanto, apesar do seu papel essencial o ferro elemental cataliza a formação de espécies reactivas de oxigénio via reacção de Fenton (Figura 11). O radical hidroxilo formado é altamente reactivo e potencialmente tóxico danificando o ADN

e peroxidando membranas biológicas. O potencial tóxico do radical hidroxilo é demonstrado pelo facto de ser utilizado pelos fagócitos dos organismos superiores como elemento microbicida.

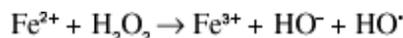


Fig. 11 – Reacção de Fenton, com a formação de espécies reactivas de oxigénio.

Assim, todos os organismos, especialmente os microorganismos, terão de lidar com o ferro tendo em conta o seu carácter ambivalente, isto é, terão de satisfazer as suas necessidades nutricionais, minimizando no entanto os efeitos tóxicos resultantes dos danos oxidativos.

A importância do ferro é tal que, de todos os macronutrientes comumente utilizados pelos organismos como o carbono, o azoto, o fósforo, o enxofre, o potássio, o magnésio, o cálcio, o sódio e o ferro, é o único cuja restrição é utilizada como mecanismo de defesa pelos organismos superiores em caso de infecção, limitando a já de si restrita pool de ferro existente. Essa limitação ocorre através da diminuição da sua libertação das células ou por associação a proteínas de armazenamento como a ferritina [14]. Por esta razão, um sintoma comum a muitas infecções é uma anemia latente. Já em 1875 Troesseau alertava os estudantes de medicina em Paris para os perigos de tratar a anemia resultante da tuberculose com ferro. São inúmeros os trabalhos em que se demonstra uma virulência aumentada por suplementação de ferro durante uma infecção num modelo animal, *Aeromonas* spp., *Clostridium* spp., *Corynebacterium* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Neisseria* spp., *Pasteurella* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Vibrio* spp., *Yersinia* spp. *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium tuberculosis* [15].

Podemos então considerar que a capacidade de um microorganismo patogénico de captar o ferro será, por si só, um factor de virulência determinante para a instalação de uma infecção.

4.3. Fontes de ferro disponíveis para microorganismos patogênicos

Nos humanos e noutros vertebrados o ferro proveniente da dieta é assimilado pelas células da mucosa intestinal, passando para a corrente sanguínea. Na corrente sanguínea o ferro é transportado associado a uma glicoproteína, a transferrina (Figura 12 A), até chegar aos tecidos onde é necessário. A família das transferrinas nos vertebrados é composta por três classes principais, a transferrina, encontrada em fluidos extracelulares, a lactoferrina, encontrada principalmente em mucosas e em certas células como os neutrófilos, e a ovotransferrina, (anteriormente designada por conalbumina), que se encontra essencialmente nos ovos. As três têm estruturas semelhantes, são glicoproteínas de peso molecular de cerca de 80 kDa, possuindo dois locais de ligação ao ferro. A sua constante de ligação ao ferro é da ordem do 10^{-20} . Um facto curioso a mencionar é que a transferrina circulante nunca está saturada, estando apta a captar qualquer excesso de ferro repentino que possa surgir de modo a assegurar que não há ferro livre em circulação. Além da transferrina outra fonte possível de ferro é a hemoglobina (Figura 12 B). Esta proteína associada ao transporte do oxigénio, existe nos eritrócitos em grande quantidade, mas não existe livre, apresentando-se apenas acessível mediante a destruição dos eritrócitos. A hemoglobina é um tetramero composto por duas subunidades α e duas β ligadas não covalentemente. Cada unidade possui cerca de 16 kDa, sendo o peso molecular da hemoglobina na ordem dos 60 kDa. Cada uma das referidas subunidades está associada a um grupo heme. No ambiente proteico da hemoglobina o ferro do grupo heme pode assumir o estado de oxidação de Fe^{2+} ou Fe^{3+} . É de realçar que a hemoglobina com Fe^{3+} (ferrihemoglobina ou metahemoglobina) não possui afinidade para o oxigénio. A mioglobina é uma proteína, semelhante às estruturas monoméricas da hemoglobina. Está envolvida no armazenamento de oxigénio, sendo também uma possível fonte de ferro. No entanto a sua expressão a nível do organismo é muito inferior à hemoglobina, existindo essencialmente como armazém intracelular de oxigénio, nomeadamente a nível dos músculos.

A degradação dos eritrócitos velhos ocorre ao nível do fígado e do baço por intremédio de células fagocitárias especializadas, os macrófagos. A degradação da hemoglobina origina outra fonte de ferro, o grupo heme, que existe associado a inúmeras proteínas.

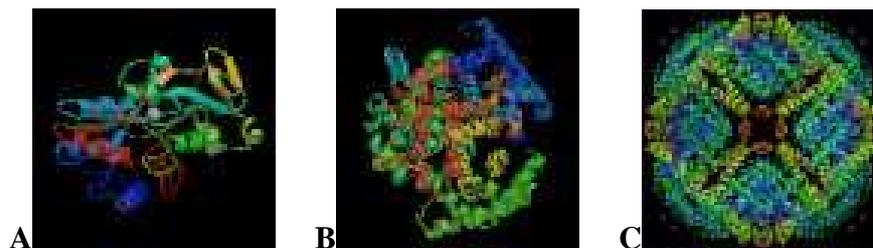


Fig. 12 – Representação esquemática das principais fontes de ferro no Homem, transferrina A; hemoglobina B e ferritina C . Imagens disponíveis no *Protein Data Base (PDB)*.

Finalmente, a ferritina (Figura 12 C), a principal proteína de armazenamento de ferro a nível dos tecidos, é outro alvo possível, nomeadamente para patogénios intracelulares. A ferritina, com um peso molecular na ordem dos 500 kDa é composta por 24 sub-unidades proteicas podendo acomodar mais de 4000 átomos de ferro, sob a forma de Fe^{3+} . Esta proteína tem o seu equivalente funcional na fitoferrina das plantas e na bacterioferritina de fungos e bactérias.

Assim, o Homem adulto possui cerca de 3,7 g de ferro, 2,5 g (67%) encontra-se associado à hemoglobina, cerca de 1 g está armazenado na ferritina (27%) e o restante cerca de 0,2 g (6%), está associado transientemente a transferrina e a outras proteínas.

4.4. Principais mecanismos de captura de ferro por microorganismos.

Microorganismos como fungos e bactérias desenvolveram estratégias variadas para sequestrar o ferro do meio ambiente/hospedeiro [15-18].

A utilização de sideróferos, moléculas de baixo peso molecular com alta afinidade para o Fe^{3+} , derivados de compostos como a ornitina (enterobactina), lisina (aerobactina), ácido salicílico (micobactina) e do citrato (complexonas), é uma das mais disseminadas estratégias para capturar ferro. Estes compostos, competem com as proteínas do hospedeiro encarregadas do transporte e armazenamento do ferro. Receptores específicos da superfície do microorganismo permitem captar o ferro e reciclar o siderófero. Esta é uma das estratégias usadas por microorganismos patogénicos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter* spp., *Candida albicans* entre outros. Alguns fungos desenvolveram também a capacidade de utilizar sideróferos de

outros organismos. Um exemplo paradigmático desta capacidade é o *Rhizopus* spp. capaz de utilizar o desferal (siderofero bacteriano) como fonte de ferro. Outros organismos utilizam as proteínas e outras moléculas do hospedeiro para próprio proveito, por exemplo a *E. coli* possui receptores para captar o heme livre, enquanto que a *Neisseria gonorrhoeae*, o *Haemophilus influenzae*, o *Vibrio cholerae* e o *Campylobacter jejuni* são capazes de captar a hemoglobina. A captação de grupo heme/hemoglobina está, por vezes, associada à secreção de hemolisinas, capazes de lisar os eritrócitos promovendo assim a libertação de heme/hemoglobina. Mecanismos deste tipo estão descritos para *E. coli*, *V. cholerae*, *Plasmodium* spp. entre outros. O *Corynebacterium diphtheriae* apresenta uma estratégia ligeiramente diferente sendo capaz de subtrair o ferro ao grupo heme por acção de uma heme-oxigenase que degrada o grupo heme libertando o ferro. Obviamente a transferrina, sendo a principal forma de ferro na corrente sanguínea, é um alvo apetecível, e bactérias como *Neisseria* spp, *Haemophilus* spp e *V. cholerae* possuem receptores de superfície que ligam especificamente a holotransferrina (transferrina carregada) ou a hololactoferrina. Alguns destes receptores são capazes de distinguir as formas carregadas (holo) das formas não carregadas (apo), tal como foi também descrito para *Neisseria* spp e *Trypanosoma brucei*. Nestes casos o processo de captação é mediado por receptores distintos para lactoferrina e a transferrina, não tendo sido identificado um receptor capaz de reconhecer ambas as proteínas. Outro método de aquisição do ferro comum é a utilização de proteases que clivam as proteínas do hospedeiro libertando o ferro tal como está descrito para *Bacillus subtilis* [19]. *Listeria monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *Bifidobacterium bifidus*, *Streptococcus mitis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *E. coli* são capazes de reduzir o ferro da sua forma férrica (III) à sua forma ferrosa (II) graças à acção de reductases de superfície associadas à membrana citoplasmática, libertando o ferro da lactoferrina e da transferrina, o qual é de seguida transportado através da membrana por transportadores ABC (“ATP Binding Cassete”). Estes transportadores ABC fazem parte de uma família conservada de transportadores existentes em todos os organismos. São normalmente proteínas integrais de membranas associadas ao transporte activo de múltiplas substâncias (íões, lípidos, drogas, polipéptidos).

Em virtude da importância do ferro, a evolução dotou os organismos com mais do que um sistema de captação do ferro, conferindo-lhes assim uma grande flexibilidade nutricional, não os tornando dependentes de uma única fonte de ferro. Por exemplo,

Neisseria meningitidis tem receptores de superfície separados que ligam transferrina, lactoferrina, hemina e hemoglobina.

4.5. A captação do ferro pela *Leishmania*

A primeira evidência da importância do ferro é o facto da *Leishmania*, cultivada em laboratório utilizando meio complexos ou definidos, crescer em meios suplementados com sangue, hemina, hemoglobina ou soro bovino fetal (SBF) [20]. A inclusão da hemina, ou outra fonte de protoporfirina IX, nos meios é um pressuposto essencial pois estes parasitas, bem como todos os tripanossomatídeos, são incapazes de sintetizar o grupo heme devido à falta de enzimas necessárias para a síntese do anel de protoporfirina IX [21]. A via biossintética da síntese do grupo heme nos eucariotas está representada esquematicamente na figura 13. Em 2002 estudos de complementação genética em *L. amazonensis*, [22], indicam que muito provavelmente cinco das enzimas envolvidas na via biossintética estão ausentes (Figura 13). No entanto, trabalhos anteriores indicam que a enzima ALA sintetase é funcional em *L. donovani* [23, 24], e *T. cruzi* [25]. Apenas a ferroquelatase, última enzima da via, que promove a incorporação do ferro no anel de protoporfirina IX parece encontrar-se activa em todos os tripanossomatídeos [22-25].

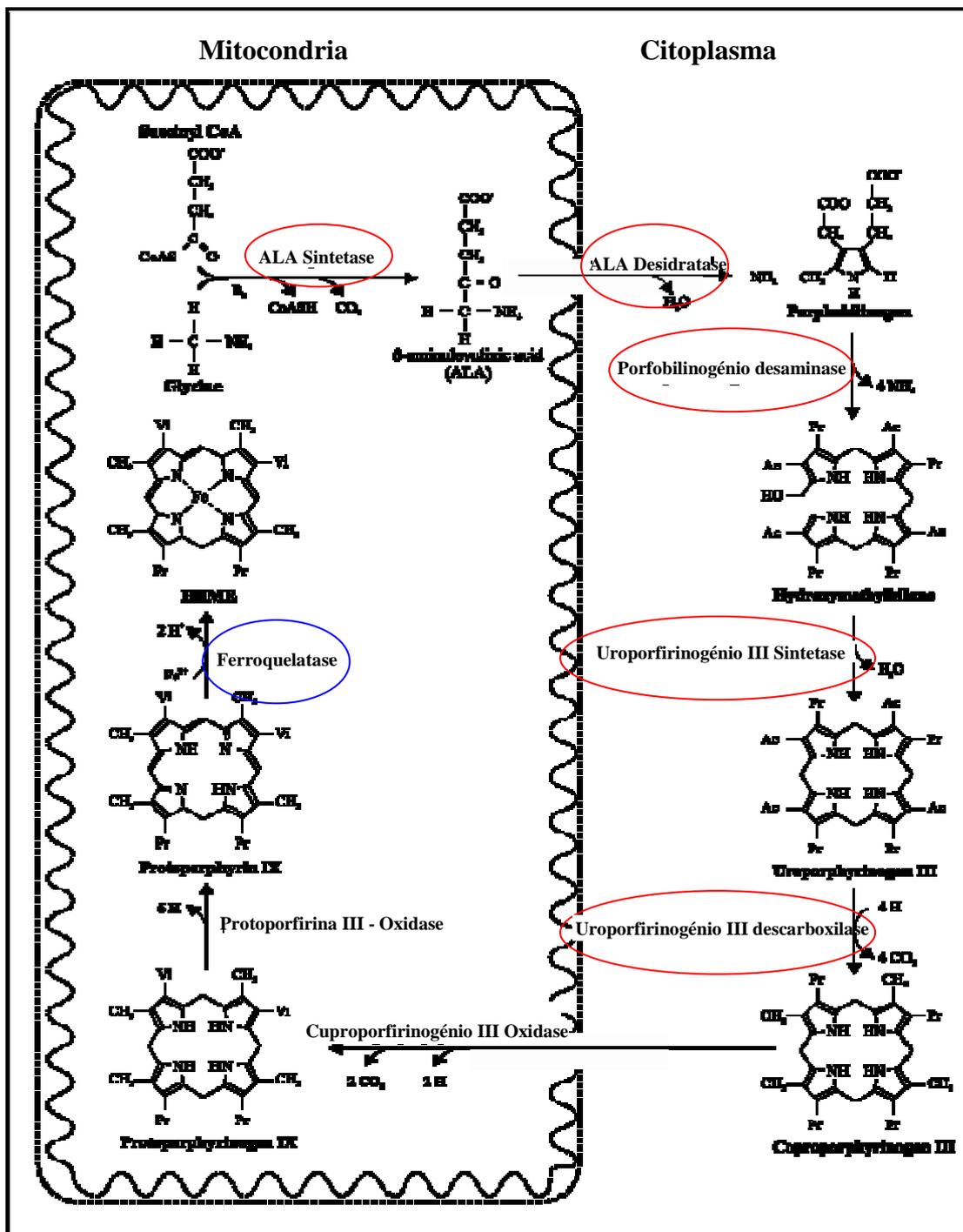


Fig. 13 – Via biossintética do grupo heme em eucariotas. Realçadas a vermelho estão as enzimas em falta nos tripanossomatídeos [22], a azul está a Ferroquelatase, enzima presente nos tripanossomatídeos.

Todos os trabalhos realizados em *Leishmania* sobre a captação de ferro incidem sobre a forma promastigota. Formas promastigotas de *L. chagasi* são capazes de utilizar a transferrina, a lactoferrina e a hemina como fontes de ferro [26]. A transferrina e a lactoferrina foram alvo de vários trabalhos [26-28], existindo indícios da existência de receptores específicos. Uma hipotética proteína de 70 kDa chegou a ser descrita como o possível receptor da transferrina [28]. Porém, estudos subsequentes revelaram interações inespecíficas com outras proteínas, como a albumina, colocando em causa a possibilidade de efectivamente se tratar de um receptor específico [29]. Em 2002 foi proposto, em *L. chagasi*, um mecanismo de captação do ferro, proveniente da transferrina e da lactoferrina, mediante a acção de elementos redutores. Neste caso o modelo proposto assumia a existência de reductases que facilitariam a internalização do ferro proveniente da transferrina e da lactoferrina por intermédio de um evento de redução que libertaria o ferro da proteína [29]. Em 1988 foi caracterizado bioquimicamente um possível receptor de superfície para o grupo heme e outras protoporfirinas [30], um bom indicador sobre a possível utilização de hemina como fonte de ferro. A hemoglobina, outra fonte de ferro fisiológica pode ser, tal como a hemina, utilizada pelos parasitas como fonte de ferro [31]. Conforme descrito para *L. donovani* a captação do ferro a partir da hemoglobina ocorre através de receptores específicos envolvidos em fenómenos de endocitose, com posterior degradação intracelular da hemoglobina. O receptor nesta espécie já foi isolado e caracterizado [32, 33]. Outro processo para aproveitar o ferro presente na hemoglobina poderá consistir na degradação da hemoglobina mediante a acção proteases extracelulares que processariam a hemoglobina libertando o heme, que seria depois utilizado como fonte de ferro. Só a título de exemplo foi descrita e isolada recentemente em *L. amazonensis* uma protease serínica excretada que tem como um dos substratos a hemoglobina [34].

Como já foi referido não foi feito nenhum trabalho significativo com a forma amastigota do parasita, provavelmente porque as culturas axénicas de *Leishmania* são de difícil manuseamento e manutenção ao contrário do que se passa com a forma promastigota. O estudo da captação do ferro pela forma amastigota assume, porém, um interesse acrescido pois é a forma existente no interior dos hospedeiros vertebrados, logo o alvo preferencial de abordagens terapêuticas. A forma promastigota, que existe essencialmente no insecto, tem como principais fontes de ferro as resultantes das alimentações sanguíneas do insecto, nomeadamente a transferrina, a lactoferrina, e

péptidos resultantes da degradação da hemoglobina dos eritrócitos. E na forma amastigota? A primeira grande diferença para a forma promastigota está no facto de, *in vivo*, existir no interior dos fagolisossomas dos macrófagos. Este facto obviamente condicionará as fontes de ferro do parasita. Assim as questões que se tornam pertinentes responder com este estudo são: utilizarão as formas amastigotas as mesmas fontes de ferro que as descritas para as formas promastigotas? Como será feita a captação de ferro por este estadio do parasita?

Material e métodos

1. Culturas e manutenção dos parasitas

As formas amastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) crescem em meio MAA constituído por: meio 199 H tamponado com 25 mM de HEPES, 4 mM de NaHCO₃ e suplementado com 14 mM de glucose, 5 g/ml de triptocaseína de soja, 0.2 µM de Glutamina, 12 µM de Hemina e 20% de soro bovino fetal previamente inativado a 56°C durante 30 minutos. As amastigotas foram mantidas indefinidamente em cultura através de repicagens a cada 5 dias partindo de um inoculo inicial de 1x10⁶ parasitas/mL.

2. Contagens

O método para determinar o crescimento parasitário foi por contagem directa dos parasitas. Por cada contagem individual são retirados 20 µL de cultura e diluídos num volume variável de PBS contendo 0,25% gluteraldeído. A câmara de Neubauer é carregada com 12,5 µL, ficando em repouso durante 2 minutos para sedimentar os parasitas. De seguida a câmara é colocada num microscópio óptico e procedendo-se à contagem dos parasitas com uma ampliação de 400x. Este foi o procedimento geral para todas as contagens nos diferentes ensaios.

3. Incorporação de ferro na transferrina e na lactoferrina

A transferrina e a lactoferrina foram carregadas no laboratório. A transferrina e a lactoferrina podem ser transformadas na sua forma holo, carregada com ferro, mediante o procedimento experimental abaixo descrito. A transferrina e a lactoferrina tem maior afinidade para o ferro a pH alcalino, assim o carregamento deve ser feito em tampão carbonato em virtude do efeito sinérgico que o ião carbonato tem sobre a ligação de ferro à

proteína. O nitrilotioacetato, NTA, é um quelante de baixo peso molecular que vai funcionar de dador de Fe^{3+} à transferrina. A sua presença num grande excesso relativamente ao ferro 5:1, assegura que todo o ferro em solução passa para a forma de Fe^{3+} -NTA. O procedimento seguido foi o seguinte: FeCl_3 foi quelatado ao NTA na proporção molar de 1:5 em tampão carbonato (0,1 M pH 8,6). O complexo Fe-NTA foi incubado durante a noite 4°C na proporção molar de 1:2 em tampão carbonato. De seguida a proteína foi concentrada, utilizando o sistema Centriprep 30 da Amicon, e quantificada pelo método de Lowry. A percentagem de saturação foi determinada pela relação entre a absorvância a 465 e 280 nm. Percentagens de saturação acima dos 80 % eram normalmente obtidas. Este foi o procedimento geral para carregar a transferrina e a lactoferrina nas diferentes experiências.

4. Ensaios de crescimento

Para todos os testes que envolviam curvas de crescimento parasitário o procedimento geral foi o seguinte: um inoculo inicial de parasitas estacionários de 5×10^6 amastigotas foi colocado a crescer em 5 mL de meio Fi (ver ponto 7.) complementado com os componentes definidos nos diferentes ensaios. O pH dos meios com base em Fi foi acertado para 6,4 e o meio esterilizado pela passagem por um filtro de 0,2 μm . O crescimento parasitário foi controlado através de contagens diárias, em triplicado, como foi acima descrito.

5. Determinação de viabilidades celulares por citometria

A viabilidade celular pode ser determinada por citometria de fluxo mediante a incorporação pelas células de uma sonda fluorescente, o iodeto de propídeo. Este é um agente intercalante do DNA, semelhante ao brometo de etídeo utilizado para corar géis de agarose convencionais, no entanto, o facto de as células não serem permeáveis a este composto torna possível a sua utilização em ensaios de viabilidade. Apenas células que tenham a sua integridade membranar comprometida é que vão incorporar este composto. O

citómetro vai detectar a fluorescência no interior das células permitindo determinar a percentagem de viabilidade.

Parasitas na concentração de 8×10^7 /mL foram colocados a crescer em MAA na presença dos diferentes compostos utilizados nos ensaios, DTT, dinitrosulfonato de potássio, 2-2'-dipiridil. A gama de concentrações e os tempos de incubação foram os utilizados nos ensaios envolvendo esses compostos. Após os tempos de incubação, 1×10^6 células foram ressuspensas em MAA e analisados no citómetro. Após selecção da população de amastigotas esta foi analisada tendo se removido as células que incorporaram iodeto de propídeo. Como controlo utilizaram-se parasitas a crescer em MAA20 cuja viabilidade estimada ronda os 88%.

6. Quantificação do ferro no SBF

A quantidade de ferro no soro foi determinada espectrofotometricamente utilizando Ferene. Neste ensaio todo o ferro é reduzido à sua forma ferrosa na presença de ácido ascórbico. O ferro ferroso forma um complexo azul com o Ferene cuja presença pode ser detectada espectrofotometricamente. O procedimento foi o fornecido pela ABX Diagnostics para determinação quantitativa *in vitro* do ferro no soro.

7. Desenvolvimento do meio alternativo de crescimento dos parasitas

Durante este trabalho foi desenvolvido um meio alternativo que permitisse o crescimento dos amastigotas de um modo dependente da adição de fontes de ferro exógenas. Esse meio designado por Fi é composto por meio 199 H tamponado com 25 mM de HEPES, 4 mM de NaHCO_3 e suplementado com 14 mM de glucose, 5 g/ml de triptocaseína de soja, 0.2 μM de Glutamina, 5 mg/mL de Protoporfirina IX e 20% de elementos do soro bovino fetal (previamente inactivado), com tamanho inferior a 30 kDa. De seguida o pH foi acertado para 6,4 e o meio esterilizado por passagem por um filtro de 0,2 μm .

A separação do SBF foi feita por ultrafiltração utilizando o sistema Centriprep 30

da Amicon. A fração inferior do soro recuperada após filtração foi esterilizada num filtro de 0,2 µm e congelada a -20° até utilização.

8. Controlo do pH de uma cultura de amastigotas

A necessidade de controlar do pH de uma cultura ao longo do tempo surgiu em virtude da existência de certas fontes de ferro que são afectadas pelo pH do meio. Mais concretamente a transferrina que perde a afinidade para o ferro a pH ácido.

Um inoculo inicial de parasitas estacionários de 5×10^6 amastigotas foi colocado a crescer em 5 mL de MAA20. O pH do meio foi verificado diariamente, num potenciómetro. Para isso os parasitas foram centrifugados 3000g durante 10 minutos e 4 mL do sobrenadante foram utilizados na determinação do pH. O sobrenadante foi de seguida esterilizado pela passagem por um filtro de 0,2 µm e adicionado à cultura.

9. Redução do Ferrocianato por acção de redutores e oxidantes

O ferrocianato de potássio é um composto que na sua forma oxidada absorve caracteristicamente a 420 nm. Na sua forma reduzida não. Para verificar este facto e testar o efeito do meio no estado de oxidação do ferrocianato realizou-se uma experiência utilizando um redutor (Ascorbato) ou um oxidante (Dinitrossulfonato de potássio).

O ensaio foi realizado em triplicado em placas de 96 poços num volume final de 200 µL de MAA. Ao MAA foi adicionado 1 mM de ferrocianato na presença de: 1 mM de dinitrossulfonato de potássio; 1 mM de ascorbato; 1 mM de ascorbato seguido de 1 mM de dinitrossulfonato de potássio (adicionado após as 6 horas de incubação). Como controlos da oxidação e redução intrínseca do meio foi adicionado a meio sem ferrocianato 1 mM de ascorbato ou 1 mM de dinitrossulfonato de potássio. Após 6 horas de incubação a 37°C a placa foi lida num leitor de placas a 420 nm. Como situação inicial foi lida uma placa com todas as situações experimentais descritas para funcionar como tempo zero e permitir calcular a variação da absorvância.

10. Redução do ferrocianato por acção de amastigotas e promastigotas

Uma vez que o ferrocianato poderia ser reduzido ou oxidado mediante eventos redox procuramos detectar actividade redutora associada aos amastigotas.

Amastigotas estacionários com quatro dias e promastigotas estacionários com 6 dias foram centrifugados a 3000g durante 10 minutos e ressuspensos em 10 mL de MAA. Este processo foi repetido mais uma vez sendo o “pellet” de parasitas ressuspensos em 1 mL. Os parasitas foram contados de seguida. Em placas de 96 poços, utilizando suspensões 8×10^7 parasitas/mL num volume final de 200 μ L de MAA, foi adicionado aos parasitas 1 mM de ferrocianato. Como controlos foram colocados parasitas só em meio de modo a verificar se a sua actividade levava á produção de substâncias que interferissem com a leitura; meio sem parasitas contendo 1 mM de ferrocianato, de modo a verificar a alteração espontânea na absorção a 420 provocada pelo meio e finalmente uma situação contendo apenas meio de modo a verificar se o efeito da auto-oxidação do meio teria influência na experiência. Após 6 horas de incubação a 37°C 150 μ L de cada poço foi centrifugado a 3000g durante 10 minutos e o sobrenadante colocado numa placa nova que foi lida num leitor de placas a 420 nm. Como situação inicial foi lida uma placa com todas as situações experimentais descritas mas sem parasitas para funcionar como tempo zero e permitir calcular a variação da absorvância.

11. Experiências com Fe⁵⁵

O ferro existe na forma de vários isotopos estáveis, alguns deles como o Fe⁵⁵ e o Fe⁵⁹ são comumente utilizados na investigação científica em virtude de a radiação por eles limitada poder ser detectada mediante a utilização de aparelhos como contadores de cintilação. O Fe⁵⁵ é menos sensível do que o Fe⁵⁹ em virtude de libertar uma radiação mais fraca, essencialmente radiação beta, porém na presença do cocktail de cintilação, os átomos de flúor contidos no cocktail vão ser excitados pela radiação beta, o átomo de flúor ao regressarem ao seu estado basal libertam luz que será detectável pelo detector do aparelho de cintilação. Este processo resulta em eficiência de contagem baixas pois nem toda a radiação emitida pelo Fe⁵⁵ vai encontrar um átomo de flúor, nem toda a luz emitida

pelo flúor vai encontrar o detector. Neste processo assume grande importância a lise das células antes da leitura pois detritos celulares vão interferir na leitura ao absorverem/desviarem a radiação emitida pelo Fe^{55} e a luz emitida pelo flúor.

Notas referentes aos ensaios com Fe^{55} :

A) Todos os ensaios com Fe^{55} foram realizados com amastigotas estacionários com quatro dias de cultura. Após lavagem em MAA e contagem os parasitas foram utilizados nos diferentes ensaios.

B) A leitura dos resultados foi efectuada num contador beta, após lise dos parasitas com 1 M NaOH e adição de 5 mL de líquido de cintilação seguida de vortexização.

12. Captação de Fe^{55} por amastigotas a 4°C e a 37°C

Numa placa de 24 poços, em triplicado, suspensões de 3×10^7 amastigotas/mL (ver A), num volume final de 250 μL de MAA, foram incubadas com 0,74 μM de Fe^{55} -NTA (complexado nas mesmas condições que as descritas para o carregamento da transferrina, considerando-se que todo o $\text{Fe}^{55}\text{Cl}_3$ adicionado vai estar sobre a forma de Fe^{55} -NTA) durante 3 horas a 4°C ou a 37°C. Após a incubação os parasitas foram recuperados e centrifugados a 3000g durante 10 minutos, este processo foi repetido mais três vezes sempre com remoção do sobrenadante e ressuspensão do “pellet”. De seguida procedeu-se à leitura do ferro associado aos parasitas (Ver B).

13. Captação de $\text{Fe}^{55}\text{Cl}_3$ ou Fe^{55} -NTA na presença de agentes redutores ou oxidantes

Previamente 0,74 μM de $\text{Fe}^{55}\text{Cl}_3$ ou Fe^{55} -NTA (complexado nas mesmas condições que as descritas para o carregamento da transferrina, considerando-se que todo o $\text{Fe}^{55}\text{Cl}_3$ adicionado vai estar sobre a forma de Fe^{55} -NTA) foram pré-incubados durante 30 minutos com 1 mM de dinitrossulfonato de potássio ou ascorbato.

Numa placa de 24 poços, em triplicado, suspensões de 3×10^7 amastigotas/mL (ver A), num volume final de 250 μL de MAA, foram incubadas durante 3 horas a 37°C na

presença de 0,74 μM de $\text{Fe}^{55}\text{Cl}_3$ ou $\text{Fe}^{55}\text{-NTA}$ (pré-incubados com redutores ou oxidantes). Como controlo para a captação normal de $\text{Fe}^{55}\text{Cl}_3$ e $\text{Fe}^{55}\text{-NTA}$, colocamos os parasitas a crescer com estas fontes de ferro (Sem pré-incubação). As placas foram colocadas a 37°C. Após a incubação os parasitas foram recuperados e centrifugados a 3000g durante 10 minutos, este processo foi repetido mais três vezes sempre com remoção do sobrenadante e ressuspensão do “pellet”. De seguida procedeu-se á leitura do ferro associado aos parasitas (Ver B).

14. Iodinação

A utilização de diferentes fontes de ferro testadas em ensaios de ligação/captação estava dependente da possibilidade de detectar o ferro ou a proteína que lhe estava associada. Assim recorreremos à iodinação para detectar a hemoglobina. A iodinação dos anéis aromáticos das tirosinas na presença de NaI e de um agente oxidante como iodogénio é um processo químico simples que permite, mediante a utilização do isótopo radioactivo ^{125}I (emissor de radiação gama), marcar proteínas radioactivamente. Estas proteínas podem ser utilizadas em vários ensaios pois a sua presença pode ser correlacionada quantitativamente com a radiação emitida através da actividade específica. A radiação emitida pode ser detectada com um contador gama.

Para proceder à iodinação de proteínas preparou-se uma coluna de G-50 em PBS, a qual, após ter sido bloqueada com uma solução de 20% BSA foi guardada a 4°C. No dia da iodinação num eppendorf colocou-se 10 μL de iodogénio dissolvido em cloreto de metilo. Após evaporação do solvente, por acção de uma corrente de azoto, quantidades até 200 μg de hemoglobina foram dissolvidas em 100 μL de 0,25 M NaHPO_4 no tubo contendo o iodogénio. 1 mCi de Na^{125}I foi então adicionado à mistura reaccional e esta foi colocada num banho de gelo durante 20 minutos, com agitação periódica de dois em dois minutos. Após este tempo a mistura foi diluída em 250 μL de 0,05 M de NaHPO_4 , transferida para um tubo novo e adicionada à coluna de G-50. Procedeu-se então à recolha de fracções de 500 μL . 2 μL de cada fracção foram colocadas num tubo RIA e os cpms contados num γ -counter. As fracções mais ricas foram guardadas a 4°C até utilização.

Para determinar a percentagem de proteína iodorada procedeu-se do seguinte modo:

a 2 µL das fracções escolhidas foram adicionados 45 µL de BSA 5% e 50 µL de 20% TCA e após vortexar a mistura os tubos foram colocadas 20 minutos a 4°C. Efectuou-se então uma centrifugação de 2 minutos a 14000g, recolheram-se os sobrenadanes e os pellets, tendo sido transferidos para tubos RIA distintos sendo a radioactividade de cada fracção medida num γ -counter. As actividades especificas rondavam os $2,6 \times 10^7$ cpms/ μ g, para iodo com actividade máxima.

Para confirmar a integridade da hemoglobina iodizada correram-se 2 µL de cada fracção num gel de SDS de poliaciamida de 10%. Após a corrida o gel foi seco e exposto contra um filme durante duas horas.

Notas referentes aos ensaios com Hemoglobina iodizada

C) Todos os ensaios com hemoglobina iodizada foram realizados com amastigotas estacionários com quatro dias de cultura. Após lavagem em MAA e contagem os parasitas foram utilizados nos diferentes ensaios.

D) A leitura dos resultados foi efectuada num contador- γ em tubos RIA, após lise dos parasitas com 1 M NaOH.

15. Captação de elementos iodizados por amastigotas a 4°C e a 37°C

Numa placa de 24 poços, em triplicado, suspensões de 3×10^7 amastigotas/mL (ver A), num volume final de 250 µL de MAA, foram incubadas com quantidades crescente de hemoglobina iodizada (Hemoglobina foi iodizada segundo o procedimento descrito no ponto 13) durante 3 horas a 4°C ou a 37°C. Após a incubação os parasitas foram recuperados e centrifugados a 3000g durante 10 minutos, este processo foi repetido mais três vezes sempre com remoção do sobrenadante e ressuspensão do “pellet”. De seguida procedeu-se à leitura do ferro associado aos parasitas (Ver D).

16. Ensaio de competição com hemoglobina iodizada

Numa placa de 24 poços, em triplicado, suspensões de 3×10^7 amastigotas/mL (ver A), num volume final de 250 µL de MAA, foram incubadas com 0,1 µM de hemoglobina

iodinada (hemoglobina foi iodada segundo o procedimento descrito no ponto 13) na presença de 10 μM de: hemoglobina não marcada; transferrina; lactoferrina; hemina e BSA durante 3 horas a 4°C. A ligação de elementos iodados na presença de apenas 0,1 μM de hemoglobina iodada serviu de controle. Após a incubação os parasitas foram recuperados e centrifugados a 3000g durante 10 minutos, este processo foi repetido mais três vezes sempre com remoção do sobrenadante e ressuspensão do “pellet”. De seguida procedeu-se à leitura do ferro associado aos parasitas (ver D).

17. Ensaio de ligação com hemoglobina iodada para verificar o tempo de saturação

Numa placa de 24 poços, em triplicado, suspensões de 3×10^7 amastigotas/mL (ver A), num volume final de 250 μL de MAA, foram incubadas com 50 nM de hemoglobina iodada (hemoglobina foi iodada segundo o procedimento descrito no ponto 13) na presença de quantidades crescentes de hemoglobina não marcada, durante 3 horas a 4°C. Após a incubação os parasitas foram recuperados e centrifugados a 3000g durante 10 minutos, este processo foi repetido mais três vezes sempre com remoção do sobrenadante e ressuspensão do “pellet”. De seguida procedeu-se à leitura do ferro associado aos parasitas (ver D).

18. Ensaio de competição homóloga com hemoglobina iodada

Numa placa de 24 poços, em triplicado, suspensões de 3×10^7 amastigotas/mL (ver A), foram incubadas com 50 nM de hemoglobina iodada (hemoglobina foi iodada segundo o procedimento descrito no ponto 13) na presença de concentrações crescentes de hemoglobina não marcada, durante 3 horas a 4°C. Após a incubação os parasitas foram recuperados e centrifugados a 3000g durante 10 minutos, este processo foi repetido mais três vezes sempre com remoção do sobrenadante e ressuspensão do “pellet”. De seguida procedeu-se á leitura do ferro associado aos parasitas (ver D).

19. Captação de hemoglobina por amastigotas a 37°C

Numa placa de 24 poços, em triplicado, suspensões de 3×10^7 amastigotas/mL (ver A), foram incubadas com quantidades crescente de hemoglobina iodada (Hemoglobina foi iodada segundo o procedimento descrito no ponto 13) durante 3 horas a 4°C ou 37°C. Após a incubação os parasitas foram recuperados e centrifugados a 3000g durante 10 minutos, este processo foi repetido mais três vezes sempre com remoção do sobrenadante e ressuspensão do “pellet”. De seguida procedeu-se à leitura do ferro associado aos parasitas (ver D).

20. Comparação de diferentes temperaturas no processo de lavagem dos amastigotas

Numa placa de 24 poços, em triplicado, suspensões de 3×10^7 amastigotas/mL (ver A), foram incubadas com 50 nM de hemoglobina iodada (Hemoglobina foi iodada segundo o procedimento descrito no ponto 13) durante 3 horas a 37°C. Após diferentes tempos de incubação a 37°C os parasitas foram recuperados e centrifugados a 3000g durante 10 minutos, este processo foi repetido mais três vezes sempre com remoção do sobrenadante e ressuspensão do “pellet”. O MAA utilizado nas lavagens foi colocado a diferentes temperaturas de modo a testar a influência da temperatura na ligação da hemoglobina á superfície do parasita. De seguida procedeu-se à leitura do ferro associado aos parasitas (ver D).

21. Presença de elementos iodados degradados após o ensaio de captação

Numa placa de 24 poços, em triplicado, suspensões de 3×10^7 amastigotas/mL (ver A), foram incubadas com 50 nM hemoglobina iodada (Hemoglobina foi iodada segundo o procedimento descrito no ponto 13) durante 3 horas de incubação a 37°C. Após a incubação os parasitas foram recuperados e centrifugados a 3000g durante 10 minutos, este processo foi repetido mais três vezes sempre com remoção do sobrenadante e ressuspensão do “pellet”. De seguida procedeu-se à leitura do ferro associado aos parasitas

(ver D). O sobrenadante foi recuperado após a primeira lavagem e filtrado através de uma coluna com um poro de 10 kDa, 3000 g durante 10 minutos, de modo a verificar a existência de elementos iodados degradados. A fracção superior e a inferior foram colocadas em tubos RIA e lidas num contador- γ .

22. Síntese da hemina

A incorporação de ferro no anel de protoporfirina é uma reacção que ocorre em condições fisiológicas mediante a acção de uma ferroquelatase. Quimicamente também é possível ocorrer a incorporação de ferro no anel de protoporfirina porém esta reacção ocorre em condições extremas sob uma atmosfera redutora. A incorporação de Fe^{55} no anel de protoporfirina permite a utilização da hemina sintetizada em vários ensaios pois a sua presença pode ser correlacionada quantitativamente com a radiação emitida através da actividade específica. A radiação emitida pode ser detectada num contador de cintilação.

A síntese de hemina foi realizada nas seguintes condições: num balão de 2 tubuladoras, 12 mg de protoporfirina IX foram completamente dissolvidos em 25 mL de ácido acético glacial e 500 μL de piridina. Após gaseificar a mistura em azoto adicionaram-se 345 pg de $^{55}\text{FeCl}_3$ e incubou-se a mistura a 80°C durante 10 minutos numa atmosfera de azoto. De seguida adicionaram-se dois volumes de éter e transferiu-se a mistura para um ampola de decantação onde se procedeu á separação das fases aquosa e etérea, descartando a primeira. Procedeu-se então à lavagem e decantação da fase etérea alternado a lavagem com um volume água ou de HCl 2,7 N. Finalmente a fase etérea resultante foi seca sob uma corrente de ar e armazenada a -20°C até utilização.

Para confirmar a síntese da hemina foi efectuado um TLC utilizando um padrão de hemina e protoporfirina. O TLC: numa atmosfera de amónia colocar uma placa de TLC com hemina e os padrões, como eluente utiliza-se uma mistura de água e lutidina (5:3). Após a corrida a placa é exposta contra um filme durante 12 horas.

A quantificação o heme sintetizado foi feita segundo o método “pyridine hemochrome”, utilizando um padrão de hemina. Resumidamente a hemina, padrões e amostra, é dissolvida em 0,1M NaOH 30 % em piridina (v/v), sendo de seguida reduzida por uns grãos de ditionite. 100 μL dos padrões com diferentes concentrações de heme e o

heme sintetizado foram adicionados a uma placas de 96 poços que de seguida foi lida num espectrofotómetro a 460 nm.

23. Captação de Fe⁵⁵ proveniente da hemina por amastigotas a 4°C e a 37°C

Numa placa de 24 poços, em triplicado, suspensões 3×10^7 amastigotas/mL (ver A), num volume final de 250 µL de MAA, foram incubadas a 4°C ou a 37°C durante 3 horas com quantidades crescentes de hemina-Fe⁵⁵ (Hemina foi marcada segundo o procedimento descrito no ponto 20). Após a incubação os parasitas foram recuperados e centrifugados a 3000g durante 10 minutos, este processo foi repetido mais três vezes sempre com remoção do sobrenadante e ressuspensão do “pellet”. De seguida procedeu-se à leitura do ferro associado aos parasitas (Ver B)

24. Ensaio de competição com hemina-Fe⁵⁵

Numa placa de 24 poços, em triplicado, suspensões 3×10^7 amastigotas/mL (ver A), num volume final de 250 µL de MAA, foram incubadas a 4°C durante 3 horas com 0,05 µM de hemina-Fe⁵⁵ (Hemina foi marcada segundo o procedimento descrito no ponto 20) na presença de: 1 µM de protoporfirina e 1 µM de hemina não marcada. A ligação de Fe⁵⁵ 0,05µM de Hemina-Fe⁵⁵ serviu de controlo. Após 3 horas de incubação a 4°C os parasitas foram recuperados e centrifugados a 3000g durante 10 minutos, este processo foi repetido mais três vezes sempre com remoção do sobrenadante e ressuspensão do “pellet”. De seguida procedeu-se à leitura do ferro associado aos parasitas (Ver B)

25. Ensaio de ligação com hemina-Fe⁵⁵ para verificar o tempo de saturação

Numa placa de 24 poços, em triplicado, suspensões 3×10^7 amastigotas/mL (ver A), num volume final de 250 µL de MAA, foram incubadas a 4°C, durante diferentes períodos de tempo, com 50 nM de hemina-Fe⁵⁵ (Hemina foi marcada segundo o procedimento

descrito no ponto 20). Após diferentes tempos de incubação a 4°C os parasitas foram recuperados e centrifugados a 3000g durante 10 minutos, este processo foi repetido mais três vezes sempre com remoção do sobrenadante e ressuspensão do “pellet”. De seguida procedeu-se à leitura do ferro associado aos parasitas (Ver B)

26. Ensaio de ligação com hemina-Fe⁵⁵

Numa placa de 24 poços, em triplicado, suspensões 3×10^7 amastigotas/mL (ver A), num volume final de 250 μ L de MAA, foram incubadas a 4°C durante 3 horas na presença de quantidades crescentes de hemina-Fe⁵⁵ (Hemina foi marcada segundo o procedimento descrito no ponto 20). Em paralelo foram adicionados também, num esquema experimental igual ao descrito, 400 nM de hemina não marcada para determinar a ligação inespecífica ao parasita. Após a incubação os parasitas foram recuperados e centrifugados a 3000g durante 10 minutos, este processo foi repetido mais três vezes sempre com remoção do sobrenadante e ressuspensão do “pellet”. De seguida procedeu-se à leitura do ferro associado aos parasitas (Ver B). A constante de ligação foi calculado utilizando o software do *Graphpad* da Prism.

27. Captação de hemina-Fe⁵⁵ a 37°C

Numa placa de 24 poços, em triplicado, suspensões 3×10^7 amastigotas/mL (ver A), num volume final de 250 μ L de MAA, foram incubadas a 37°C durante 3 horas na presença de quantidades crescentes de hemina-Fe⁵⁵ (Hemina foi marcada segundo o procedimento descrito no ponto 20). Após 3 horas de incubação a 37°C os parasitas foram recuperados e centrifugados a 3000g durante 10 minutos, este processo foi repetido mais três vezes sempre com remoção do sobrenadante e ressuspensão do “pellet”. ”. De seguida procedeu-se à leitura do ferro associado aos parasitas (Ver B).

28. Titulação biológica com dipiridil

Um inoculo inicial de parasitas estacionários de 1×10^8 amastigotas estacionários 5 mL de MAA20 na presença de quantidades crescentes de dipiridil. Após 48 horas as culturas foram contadas e determinou-se a variação do crescimento. Os parasitas a crescer em $100 \mu\text{M}$ de dipiridil durante 48 horas foram centrifugados a $3000g$ durante 10 minutos e ressuspensos em MAA 20 de modo a reverter o crescimento

29. Determinação de condições de starvation utilizando dipiridil

Parasitas estacionários a 4×10^8 amastigotas foram colocados a crescer em 5 mL de MAA20 na presença de quantidades crescentes de dipiridil. Após 5 e 24 horas as culturas foram contadas e os parasitas foram utilizados em ensaios de captação de ferro, já descritos, utilizando ferro proveniente de 3 fontes diferentes, FeCl_3 , Fe-NTA e Hemina.

Resultados

1. Desenvolvimento de um meio para avaliar quais os componentes que podem ser usados como fontes de ferro para as formas amastigotas de *L. infantum*

Para determinar as fontes de ferro que permitem o crescimento da forma amastigota de *L. infantum* foi necessário desenvolver um meio adequado que possibilitasse essa determinação, ou seja, um meio que promovesse um crescimento parasitário dependente da adição de fontes exógenas de ferro.

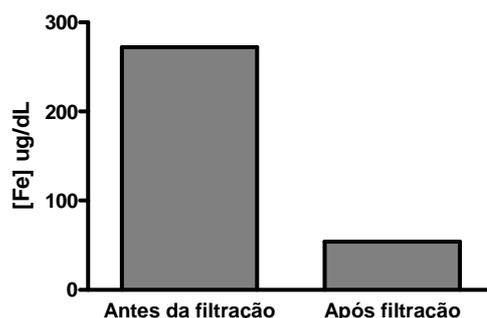


Fig. 14 - Quantidade de ferro presente no soro antes e após a filtração.

A quantidade de ferro presente no MAA20 provém essencialmente da hemina e do soro bovino fetal (SBF). A suplementação do meio com 20 % de SBF fornece determinados nutrientes essenciais para o crescimento parasitário. Porém, o SBF contém também fontes de ferro diversas como a transferrina e a hemoglobina. A transferrina e a hemoglobina são proteínas com um peso molecular de, aproximadamente, 80 e 60 kDa, respectivamente. Considerando que a maior contribuição para a pool de ferro disponível no SBF seria o ferro associado a estas proteínas, procedeu-se à sua eliminação mediante uma filtração selectiva. A filtração selectiva consistia na passagem do SBF através de uma

membrana que retém selectivamente moléculas com um peso molecular superior a 30 kDa. O filtrado resultante, designado por fracção inferior do soro, tem todos os elementos básicos do SBF excepto proteínas de peso molecular elevado, diminuindo substancialmente o conteúdo em ferro do soro utilizado.

Este processo de filtração removeu cerca de 80% do ferro do SBF como se pode ver na figura 14.

A suplementação do MAA com a fracção inferior do soro, meio Fi, foi incapaz de manter o crescimento parasitário, conforme demonstrado na figura 15. Contudo, a ausência de crescimento dos parasitas em Fi podia dever-se a dois factores: a falta de componentes proteicos (por exemplo albumina), que não estariam presentes no filtrado, ou então à falta de ferro/grupo heme.

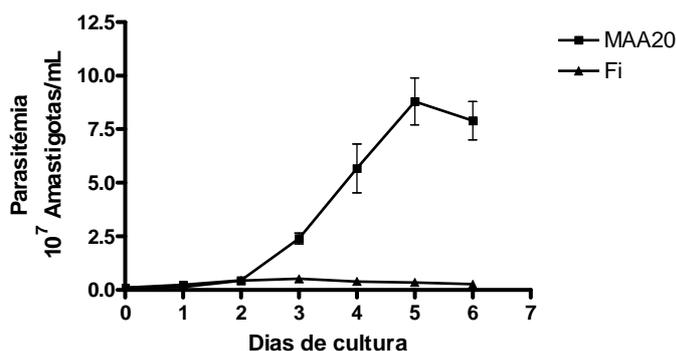


Fig. 15 – Curvas de crescimento das formas amastigotas a 37°C ao longo do tempo em MAA20 e MAA complementado com 20% de fracção inferior do soro (Fi).

A fim de testar a necessidade de complementação proteica do meio Fi, este foi enriquecido com 3% de albumina bovina sérica, BSA (Figura 16), um suplemento utilizado em muitos meios. Contudo a adição de BSA não permitiu por si só o crescimento parasitário. Pelo contrário, a adição de 8 µM de hemina permite um crescimento significativo, (Figura 16). Curiosamente, a adição de 3% BSA ao meio, Fi/Hmn, parece ter um efeito nefasto sobre o crescimento parasitário. Isto pode ser devido à capacidade da BSA para se ligar ao ferro e ao heme, funcionando como um quelante.

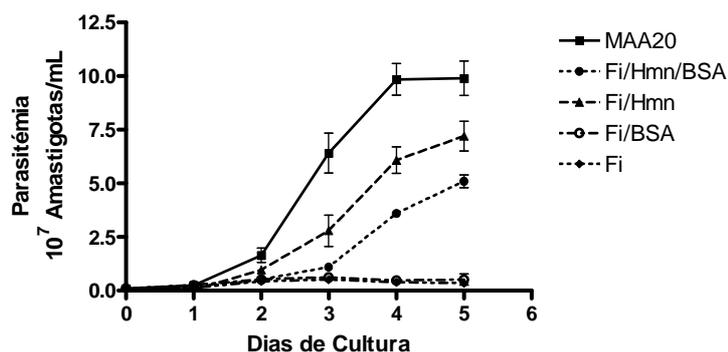


Fig. 16 - Curvas de crescimento das formas amastigotas a 37°C ao longo do tempo em meio Fi suplementado com: 8 µM hemina e 3% de BSA (Fi/Hmn/BSA); 8 µM de hemina, (Fi/Hmn); 3% de BSA, (Fi/BSA). Como controlos utilizaram-se parasitas em MAA 20 e parasitas em apenas meio Fi. Curva representativa de duas experiências realizadas em duplicado.

A utilização de hemina como fonte de ferro nos testes de optimização do meio é justificada em virtude da conhecida incapacidade dos tripanossomatídeos de sintetizarem o grupo heme. Porém, utilizando a hemina como fonte de ferro fica a duvida se é o ferro ou o grupo heme, mais propriamente o anel aromático, que facilita o crescimento parasitário. Para analisar este ponto testou-se o efeito da adição de protoporfirina IX a uma fonte de ferro, ferro quelatado com nitrilotriacetato (Fe-NTA) (Figura 17). A junção de 8 µM de Fe-NTA ao meio Fi permitiu o crescimento parasitário embora a um nível inferior ao obtido quando se adiciona hemina. No entanto, este crescimento não foi maior na presença de protoporfirina. Pelo contrário verificou-se uma inibição da replicação do parasita.

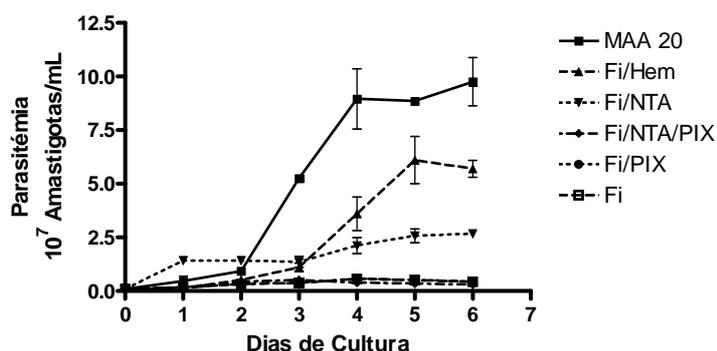


Fig. 17 - Curvas de crescimento das formas amastigotas a 37°C ao longo do tempo, em meio Fi suplementado com: 8 µM hemina (Fi/Hmn); 8 µM de Fe-NTA (Fi/NTA); 8 µM de NTA e protoporfirina (Fi/NTA/PIX); 8 µM de protoporfirina (Fi/PIX). Como controlos utilizaram-se parasitas em MAA 20 e parasitas em meio Fi (não complementado). Curva representativa de duas experiências realizadas em duplicado.

De modo a atenuar um eventual efeito tóxico por parte da protoporfirina IX foram efectuadas curvas de crescimento com Fe-NTA e diferentes concentrações de protoporfirina IX. Conforme se verifica na figura 18, concentrações acima de 7 μM têm um efeito negativo sobre o crescimento parasitário. Porém nas concentrações, entre 0,4 e 3,5 μM , a protoporfirina IX parece contribuir para um crescimento um pouco superior ao verificado quando o meio contém apenas Fe-NTA (Figuras 17 e 18).

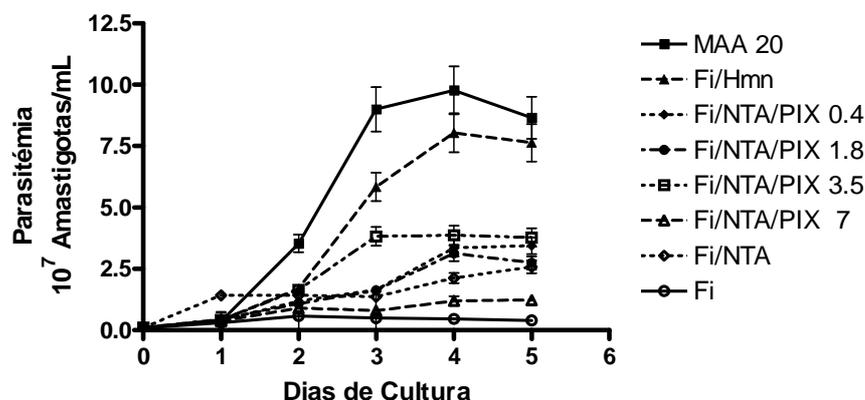


Fig. 18 - Curvas de crescimento das formas amastigotas a 37°C ao longo do tempo em meio Fi suplementado com: 8 μM hemina Fi/Hmn; 0,4 μM de protoporfirina e 8 μM de Fe-NTA (Fi/NTA/PIX 0,4); 1,8 μM de protoporfirina e 8 μM de Fe-NTA (Fi/NTA/PIX 1,8); 3,5 μM de protoporfirina e 8 μM de Fe-NTA (Fi/NTA/PIX 3,5); 7 μM de protoporfirina e 8 μM de Fe-NTA (Fi/NTA/PIX 7) e 8 μM de Fe-NTA, Fi/NTA. Como controlos foram utilizadas parasitas em MAA 20 e parasitas em apenas meio Fi. Curva de uma experiência realizada em duplicado.

Consideramos assim que tanto o ferro como o anel de protoporfirina são importantes. Nas experiências subsequentes utilizou-se 1,8 μM de protoporfirina como suplemento às fontes de ferro não hémicas. A adição de apenas protoporfirina IX não permite crescimento parasitário significativo, no entanto a sua presença no meio é importante para o crescimento (Figura 19).

Como passo final para a validação do meio desenvolvido era importante demonstrar que, na presença de ferro, este meio contém todos os elementos necessários para o crescimento das formas amastigotas. Conforme se verifica na figura 20 o meio Fi/Hmn permitiu a replicação das formas amastigotas durante 3 repicagens sucessivas, não tendo sido detectada qualquer diferença no crescimento.

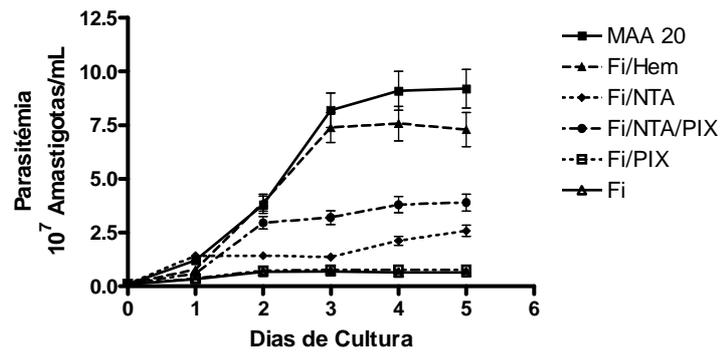


Fig. 19 - Curvas de crescimento das formas amastigotas a 37°C ao longo do tempo, em meio Fi suplementado com: 8 µM hemina (Fi/Hem); 8 µM de Fe-NTA, Fi/NTA; 1,8 µM de protoporfirina IX e 8 µM de Fe-NTA, (Fi/NTA/PIX); 1,8 µM de protoporfirina, (Fi/PIX). Como controles utilizaram-se parasitas em MAA 20 e parasitas em Fi. Curva de uma experiência realizada em duplicado.



Fig. 20 - Curvas de crescimento das formas amastigotas a 37°C ao longo do tempo, em meio Fi suplementado com: 8 µM hemina ao longo de três repicagens sequenciais, primeira (Fi/Hmn I), segunda (Fi/Hmn II) e terceira (Fi/Hmn III). Como controles utilizaram-se parasitas em MAA 20 e parasitas em apenas meio Fi. Curva de uma experiência realizada em duplicado.

2. Determinação das fontes de ferro que permitem o crescimento parasitário em meio

A fim de determinar quais as fontes de ferro que suportam a replicação das formas amastigotas de *L. infantum*, efectuaram-se curvas de crescimento utilizando o meio Fi complementado com 8 µM de ferro proveniente das seguintes fontes, hemina, transferrina, lactoferrina, ferritina, FeCl₃, NTA e hemoglobina (Figura 21).

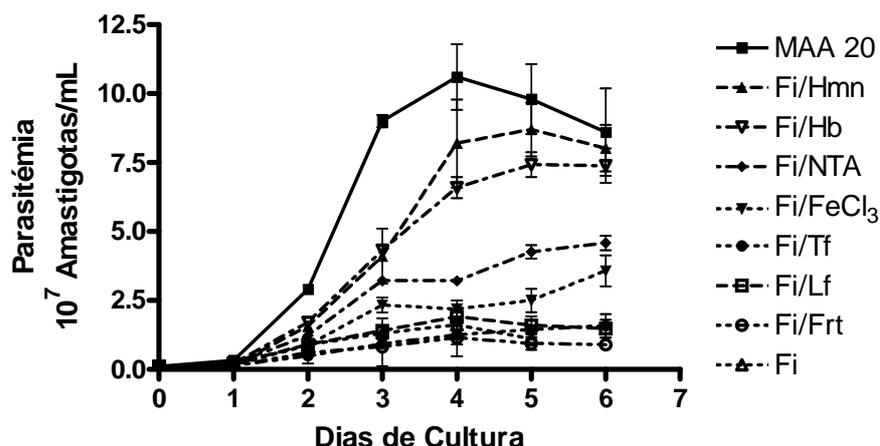


Fig. 21 - Curvas de crescimento das formas amastigotas a 37°C ao longo do tempo, em meio Fi suplementado com 1,7 μ M de protoporfirina e: 8 μ M de hemina, (Fi/Hmn); 8 μ M de FeCl₃, (Fi/FeCl₃); 8 μ M de Fe-NTA, (Fi/NTA); 4 μ M de transferrina, (Fi/Tf); 4 μ M de lactoferrina, (Fi/Lf); 2 μ M de hemoglobina, (Fi/Hb); 8 μ M de Ferritina, (Fi/Frt). Como controles foram utilizadas parasitas a em MAA 20 e parasitas em apenas meio Fi. Curva representativa de um mínimo de três experiências realizadas em triplicado, exceptuando a ferritina que foi apenas testada duas vezes.

A suplementação do meio Fi com diferentes fontes de ferro revelou a seguinte tendência: as fontes que permitiram um crescimento mais intenso foram as fontes hêmicas, como a hemoglobina e a hemina. Fontes não hêmicas, como o Fe-NTA e o FeCl₃, suportaram uma replicação significativa, mas inferior à obtida para a hemina e a hemoglobina. Por fim, a lactoferrina, a transferrina e a ferritina não permitiram crescimento significativo das formas amastigotas.

A duplicação da quantidade de hemina no meio Fi (Figura 22) não trouxe um aumento significativo do crescimento. Porém, a duplicação de fontes não hêmicas pareceu ter um efeito positivo no crescimento, sendo mais intenso para o NTA do que para o FeCl₃. No caso do FeCl₃ em concentrações superiores a 160 μ M este passa a ser visivelmente insolúvel no meio impossibilitando a sua análise. Para o Fe-NTA, com concentrações superiores a 200 μ M deixou de se observar um aumento dependente da concentração. Estes resultados sugerem diferenças na biodisponibilidade das diferentes formas de ferro testadas, e/ou diferenças na eficiência de captação dessas fontes, relacionada com o tipo de transporte, velocidade de internalização e número de receptores/transportadores.

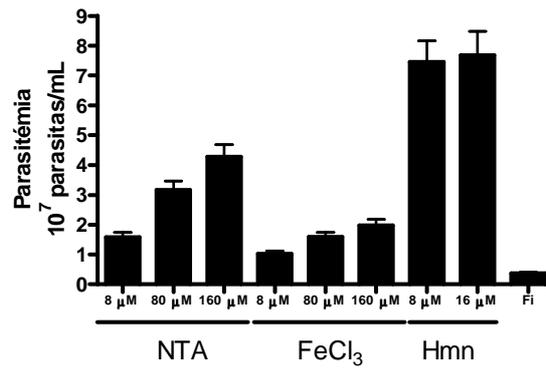


Fig. 22 – Crescimento ao fim de 5 dias em meio Fi complementado com diferentes quantidade de Fe-NTA (NTA) , FeCl₃ e hemina (Hmn). Gráfico representativo de duas experiências realizadas em duplicado.

A ausência de crescimento das formas amastigotas na presença de transferrina foi inesperada em virtude de alguns resultados publicados. Com o objectivo de confirmar este resultado, colocaram-se formas amastigotas a crescer na presença de diferentes tipos desta proteína: holotransferrina carregada no laboratório, holotransferrina parcialmente carregada e apotransferrina. Nenhuma destas proteínas foi capaz de promover o crescimento das formas amastigotas (Figura 23).

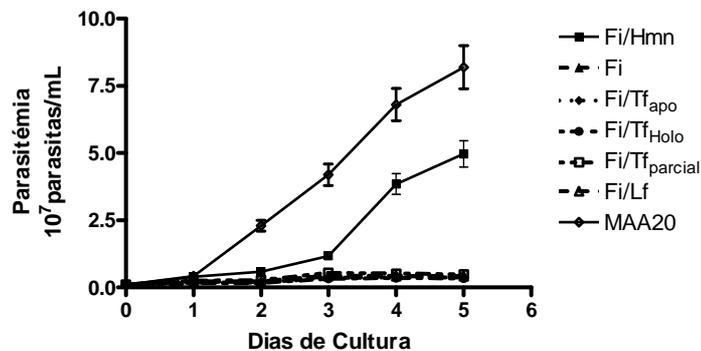


Fig. 23 - Curvas de crescimento das formas amastigotas a 37°C ao longo do tempo, em meio Fi suplementado com 1,7 μM de protoporfirina e: 4 μM de hemina (Fi/Hmn); 4 μM de apo-transferrina (Fi/Tf_{apo}); 4 μM de holo-transferrina (Fi/Tf_{holo}); 4 μM de transferrina parcialmente carregada (Fi/Tf_{parcial}). Como controlos utilizaram-se parasitas em MAA 20 e parasitas em apenas meio Fi. Curva de uma experiência realizada em triplicata.

A ausência de crescimento das formas amastigotas na presença de transferrina é confirmado por dados fisiológicos. No pH ácido do fagolisossoma o ferro associado à transferrina deverá dissociar-se espontaneamente. Em cultura os amastigotas também

acidificam o meio sobrevivendo a um pH ácido (Figura 24) no entanto esta modelação do pH do meio decorre em função do crescimento parasitário, não se verificando na ausência de crescimento. Ao pH inicial da cultura, de aproximadamente 6,4, essa dissociação não ocorre, logo e o ferro não é libertado da transferrina. Assim, é possível que esta proteína não constitua uma fonte de ferro importante *in vitro*. No entanto talvez seja utilizada, *in vivo*, pois os iões uma vez dissociados da transferrina, poderão ser internalizados.

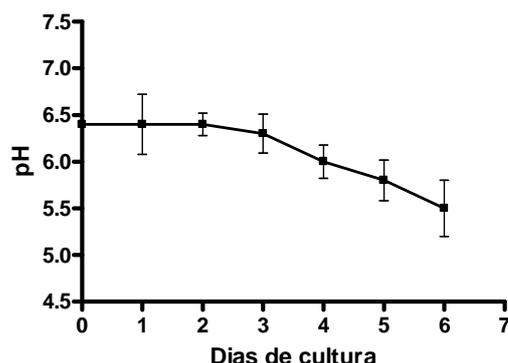


Fig. 24 – Controlo do pH de uma cultura de formas amastigotas a 37°C ao longo do tempo, em meio MAA20.

3. Estudo da captação do ferro por fontes não hémicas

Uma das fontes de ferro não hémicas utilizada foi o Fe-NTA. Este complexo é impermeável, sendo por isso necessário a remoção do ferro para ocorrer internalização. Para determinar se a captação do Fe-NTA era dependente da temperatura, incubaram-se os parasitas na presença de Fe-NTA a 4°C e a 37°C. Conforme ilustrado na figura 25 a internalização de Fe⁵⁵ proveniente do Fe⁵⁵-NTA a 37°C é aproximadamente quinze vezes superior ao observado a 4°C, sendo um indicativo da captação de ferro mediante um processo activo. Normalmente um processo de transporte activo pressupõe gasto de energia (directo ou indirecto) para transportar um determinado soluto contra o seu gradiente electroquímico. Normalmente este tipo de transporte é dependente da temperatura.

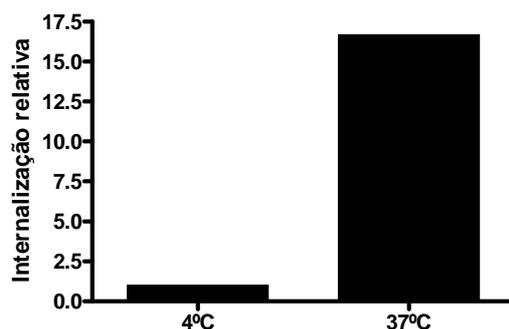


Fig. 25 - Captação relativa de Fe^{55} proveniente do complexo Fe^{55} -NTA após incubação de 3×10^7 amastigotas/mL em MAA, na presença de $0,74 \mu M$ de Fe^{55} -NTA, a $4^\circ C$ e a $37^\circ C$. Os valores obtidos são valores relativos à captação de Fe^{55} a $4^\circ C$, sendo este considerado o valor unitário. Experiência realizada em triplicado.

A captação de ferro proveniente do Fe^{55} -NTA implica provavelmente um passo de redução, pois no complexo Fe-NTA o ferro está na forma de Fe^{3+} . Para aferir a possível existência de elementos redutores no meio utilizou-se o ferrocianato de potássio, um composto que absorve caracteristicamente a 420 nm na sua forma oxidada, mas não na forma reduzida, sendo possível monitorizar a sua redução por acção de elementos redutores (Figura 26).

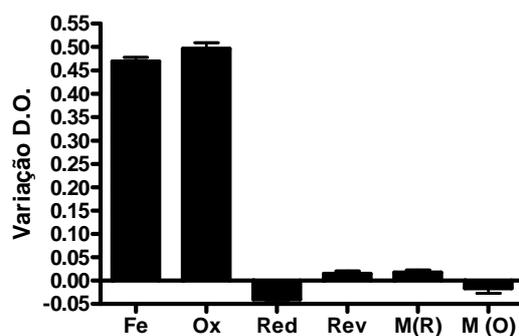


Fig. 26 – Redução do ferrocianato de potássio em MAA por intermédio da acção de redutores ou oxidantes, determinada pela variação da absorção a 420 nm antes e após 6 horas de incubação na presença de 1 mM de ferrocianato e de: 1 mM de dinitrossulfonato de potássio, (Ox); 1 mM de ascorbato, (Red); 1 mM de ascorbato seguido de 1 mM de dinitrossulfonato de potássio, (Rev). Como controlos da oxidação e redução intrínseca adicionamos ao meio 1 mM de ascorbato, (M(R)) ou 1 mM de dinitrossulfonato de potássio (M(O)). Experiência representativa de dois ensaios realizados em triplicado.

A figura 27 apresenta os valores obtidos da redução do ferrocianato de potássio por acção das formas amastigotas. Observou-se a existência de redução do ferrocianato por acção dos parasitas, porém esta é menor do que o esperado. De facto, quando as formas promastigotas foram utilizadas observou-se uma variação menor do que a esperada (comparação com os valores obtidos por M. Wilson em [29]).

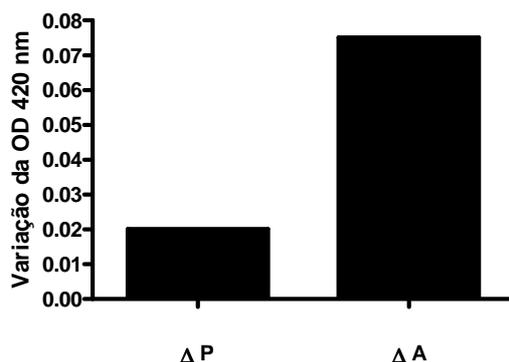


Fig. 27 – Redução do ferrocianato de potássio por acção das formas amastigotas (Δ A) ou promastigotas (Δ P). Experiência representativa de dois ensaios realizados em triplicado.

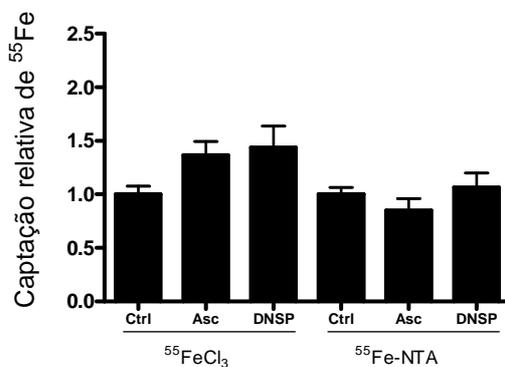


Fig. 28 - Captação de Fe^{55} , proveniente de FeCl_3 ou Fe-NTA , pelas formas amastigotas ao fim de 3 horas de incubação em meio MAA com $0,74 \mu\text{M}$ de $\text{Fe}^{55}\text{Cl}_3$ na forma livre ou complexado com NTA. O Fe^{55} foi previamente reduzido (Asc) ou oxidado (DNSP). Como controlo foi determinada a internalização de FeCl_3 e Fe-NTA na ausência de redutores ou oxidantes (Ctrl) e permitindo definir o uptake normal que será traduzido como o valor de uptake relativo unitário. Experiência representativa de três ensaios em triplicado.

Uma segunda pergunta importante relativamente às fontes não hémicas é a forma como a captação de ferro é feita, se na forma reduzida ou na forma oxidada. Como já foi

referido, o Fe-NTA mantém o ferro na forma de Fe^{3+} e o $FeCl_3$ dissocia-se em solução dando origem essencialmente a Fe^{3+} . Assim, é importante verificar se a captação de ferro é influenciada pelo estado de oxidação do composto. Para elucidar este facto realizou-se uma experiência na qual a adição de $FeCl_3$ ou Fe-NTA às formas amastigotas foi efectuada em meio redutor ou oxidante (Figura 28). O estado de oxidação do meio pareceu não influenciar a captação pelo menos para o Fe-NTA, porém pareceu existir uma tendência para um aumento da captação quando se utilizou o $FeCl_3$ quer na presença de redutor ou de oxidante.

4. Estudos sobre a captação de hemoglobina pela forma amastigota

Uma das fontes de ferro que permitiu um crescimento intenso do parasita foi a hemoglobina. Estudos com a hemoglobina implicavam a marcação desta proteína de modo a detectar a sua presença e interacção com o parasita. Assim, a iodinação oxidativa das tirosinas pareceu a melhor alternativa, por permitir a detecção a presença de elementos iodinados no interior do parasita. A hemoglobina iodinada, (figura 29), foi utilizada nos ensaios subsequentes. Como se pode ver pela figura 28 a hemoglobina está iodinada, as fracções de peso inferior correspondem aos monómeros das cadeias α e β (tamanho estimado de 16 kDa). A fracção superior corresponde aos dímeros compostos pelas duas cadeias α e β (tamanho estimado de 32 kDa).

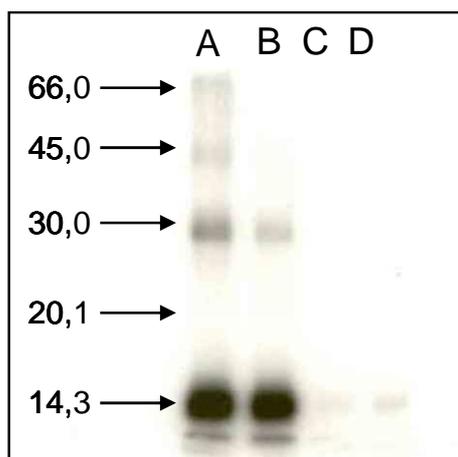


Fig. 29 –Imagem resultante da exposição de um gel de SDS carregado com 2 μ L das quatro melhores fracções obtidas durante a iodinação da hemoglobina. (A-D) fracções distintas de hemoglobina iodinada. À esquerda, os pesos moleculares dos marcadores (não visíveis) em kDa.

Para determinar se a captação da hemoglobina era dependente da temperatura, os parasitas foram incubados na presença de hemoglobina iodinada a 4°C e a 37°C (Figura 30). O aumento da captação de elementos iodinados a 37°C permite especular sobre a presença de um mecanismo de captação dependente da temperatura, isto é, via receptores específicos implicando actividade enzimática e/ou transportadores.

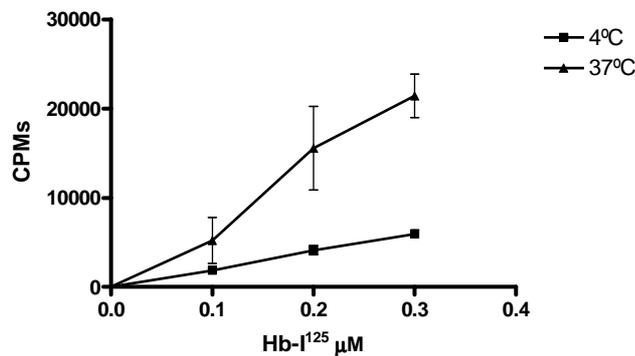


Fig. 30 – Captação de elementos iodinados pelas formas amastigotas ao fim de 3 horas de cultura em MAA, a a 4°C e a 37°C na presença de quantidades crescentes de hemoglobina iodinada. Experiência representativa de três ensaios realizados em triplicada.

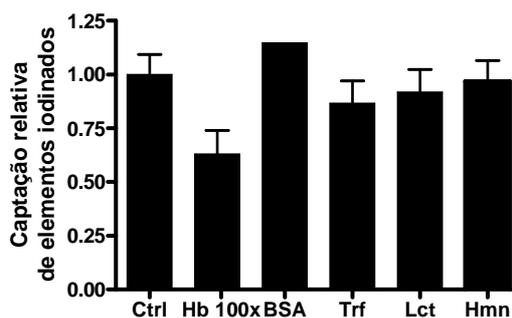


Fig. 31 - Ligação de elementos iodinados pelas formas amastigotas ao fim de 4 horas a 4°C num ensaio de competição utilizando 0,1 μM de hemoglobina iodinada, juntamente com 10 μM de: hemoglobina não marcada (Hb 100x); transferrina, (Trf); lactoferrina, (Lct); hemina, (Hmn) e albumina bovina sérica (BSA). A ligação de elementos iodinados na presença de apenas 0,1 μM, (Ctrl) de hemoglobina iodinada serviu de controlo e permitiu definir a ligação normal que se considera o valor de ligação relativo unitário. Experiência representativa de três ensaios realizados em triplicado, com excepção da BSA e da lactoferrina que foram apenas dois ensaios em triplicado.

O ensaio de especificidade a 4°C (Figura 31) sugere que a ligação da hemoglobina pode ser específica, não sendo significativamente competida por proteínas como a transferrina, a lactoferrina e a BSA.

O estudo da possível ligação da hemoglobina a um receptor pressupõe a determinação da constante de dissociação, K_d , uma constante que reflecte a afinidade do receptor para o ligando. ao primeiro passo para a determinação do K_d é a determinação do tempo que a ligação de uma determinada concentração de hemoglobina demora a atingir o equilíbrio com os receptores presentes. Este tempo de equilíbrio reflecte uma condição vital para a determinação da constante de afinidade. Pela figura 32 podemos observar que se trata de um processo relativamente rápido, uma vez que ao fim de 30 minutos já foi atingido um estado de equilíbrio. Assim, os ensaios subsequentes foram realizados com incubações de 3 horas de modo a assegurar as condições de equilíbrio para todas as concentrações testadas.

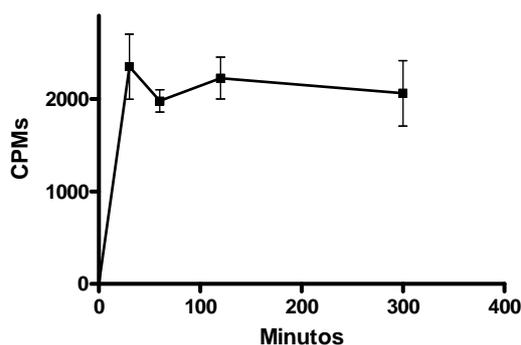


Fig. 32 – Ligação de 50 nM de hemoglobina iodada ao parasita em função do tempo a 4°C. Experiência representativa de três ensaios realizados em triplicado.

Uma vez que os ensaios de ligação pressupunham a utilização de hemoglobina marcada com ^{125}I , a abordagem escolhida para a determinação da K_d foi a competição homóloga, e não o uso de uma curva de saturação, pois este tipo de ensaio implica a utilização de menores quantidades de hemoglobina iodada e, portanto, uma maior segurança para o utilizador. Este tipo de determinação obriga a trabalhar numa ordem de grandeza de competidor (a hemoglobina fria) que permita a visualização de um decréscimo da quantidade da hemoglobina ligada por efeito da competição com a hemoglobina iodada

ligada aos receptores. Assim para determinar a ordem das concentrações nas quais se teria que realizar o ensaio efectuou-se um teste de competição preliminar, conforme apresentado na figura 33. Para 50 nM de hemoglobina iodizada as concentrações óptimas de competidor seriam entre 10 μ M e 10 mM (Figura 32) o intervalo entre o log[Hb] de -2 e -5).

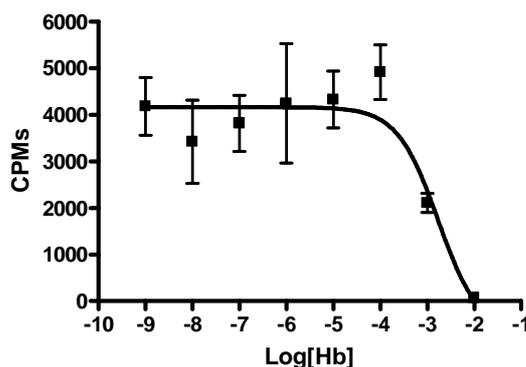


Fig. 33 – Ligação de 50 nM de hemoglobina iodizada ao parasita em função do tempo após 3 horas de incubação a 4°C na presença de quantidades crescentes de hemoglobina fria. Experiência realizada em triplicado.

A determinação da Kd feita segundo os parâmetros acima determinados situa-se na ordem dos μ M, variando entre os 2 e os 32 μ M de acordo com os valores apresentados na figura 34.

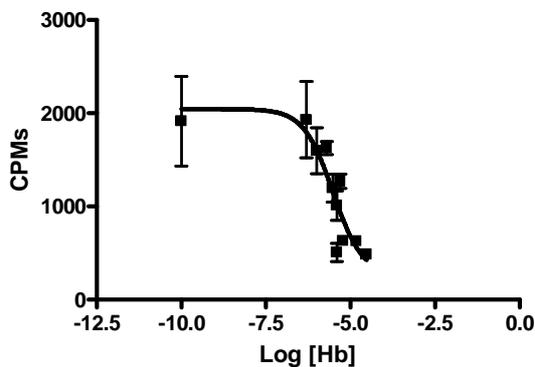


Fig. 34 - Ligação de 50 nM de hemoglobina iodizada ao parasita, ao fim de 3 horas a 4°C, na presença de quantidades crescentes de hemoglobina fria. A Kd determinada por regressão linear utilizando o *Graphpad da Prism* foi de 2,98 μ M. Experiência representativa de cinco ensaios realizados em triplicado.

Uma vez que os resultados obtidos sugerem a presença de um receptor/transportador específico tentou-se determinar a constante de captação, K_m . Porém, tal não foi possível a determinar o valor desta constante no tempo útil de realização do mestrado. Os ensaios preliminares realizados não permitiram, nas concentrações testadas, determinar esta constante. As experiências realizadas indiciam a existência de dois receptores distintos, no entanto são necessários mais estudos para o afirmar. Conforme se observou no gráfico da figura 35 a captação parece seguir um padrão distinto até aos 200 μM (um facto consistente nos vários ensaios realizados), aumentando a velocidade de captação a partir deste ponto.

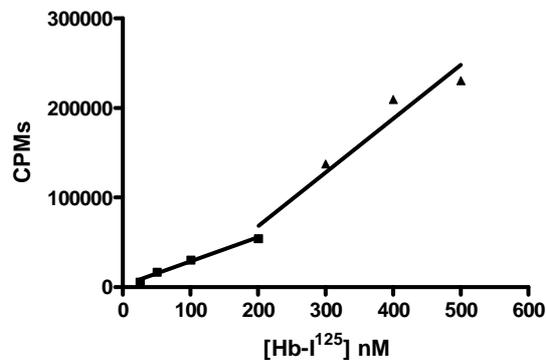


Fig. 35 – Captação de elementos iodados pelas formas amastigotas a 37°C durante 3 horas de incubação com quantidades crescentes de hemoglobina iodada. As duas rectas distintas marcam os dois padrões da captação detectados. Experiência representativa de cinco ensaios realizados em triplicado.

A dificuldade em atingir um ponto de saturação poderia ser devido a um aumento da ligação não específica da hemoglobina à superfície do parasita em virtude da temperatura do ensaio. Porém a temperatura parece não ter efeito significativo na ligação da hemoglobina à superfície do parasita, como se observa na figura 36. A lavagem dos parasitas com meio a diferentes temperaturas não revelou qualquer diferença relevante capaz de influenciar a cinética de captação, que justifique os resultados obtidos.

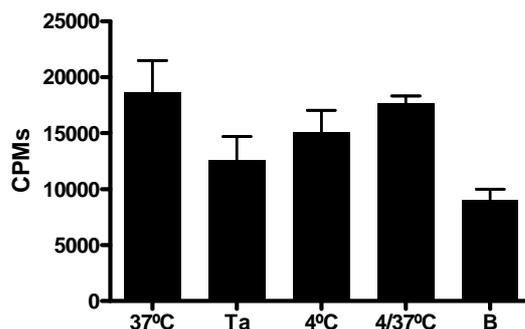


Fig.36 – Captação de elementos iodinaados pelas formas amastigotas incubadas durante 3 horas a 37°C na presença de 50 nM de hemoglobina iodinaada. Após a incubação os parasitas foram lavados com meio a 37°C; à temperatura ambiente (Ta) e a 4°C. Após as 3 horas de incubação, os parasitas foram arrefecidos a 4°C e lavados com meio a 37°C (4/37°C). Como controlo os parasitas foram incubados nas mesmas condições do ensaio mas a 4°C (B). Experiência realizada em triplicado.

A presença de elementos resultantes da degradação da hemoglobina foi testada, (Figura 37), no entanto não foram detectados níveis de degradação significativos na concentração testada.

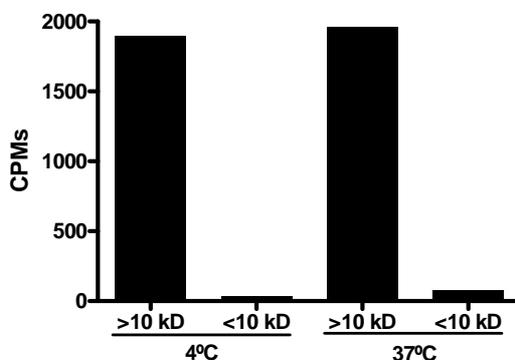


Fig. 37 – Presença de elementos iodinaados provenientes da degradação da hemoglobina pelas formas amastigotas no meio ao fim de 3 horas de incubação com 100 nM de hemoglobina iodinaada a 37°C e 4°C. Os sobrenadantes foram separados dos parasitas por centrifugação e em seguida filtrados com uma membrana com um poro de 10 kDa, de modo a recolher os elementos iodinaados degradados na fracção de menor de 10kDa.

Em conclusão a incapacidade de atingir um aumento linear da quantidade de hemoglobina não parece ser justificado por nenhum dos factores testados. Serão necessárias mais experiências antes de se poder considerar fisiológica esta possibilidade de

existirem dois receptores. Experiências em planeamento incluem, experiências de ligação com parasitas a crescer em meio Fi complementado com diferentes quantidades de hemoglobina. Estas experiências permitirão confirmar a existência de receptores distintos pois as constantes determinadas para os parasitas a crescer em meios distintos serão diferentes.

5. Estudos sobre a captação de hemina pela forma amastigota

Tal como verificado para a hemoglobina, também a hemina permitia um elevado crescimento parasitário (Figura 21). A hemina, ao contrário da hemoglobina, não pode ser iodinada. Por isso, para detectar a sua interacção com o parasita recorreu-se à incorporação química de Fe^{55} no anel de protoporfirina, originando Fe^{55} -hemina. A síntese foi confirmada por TLC utilizando como padrão a protoporfirina e a hemina (Figura 38 (I)). Conforme apresentado na (Figura 38 (II)) a exposição do cromatograma contra um filme revelou que de facto a hemina incorporou o Fe^{55} .

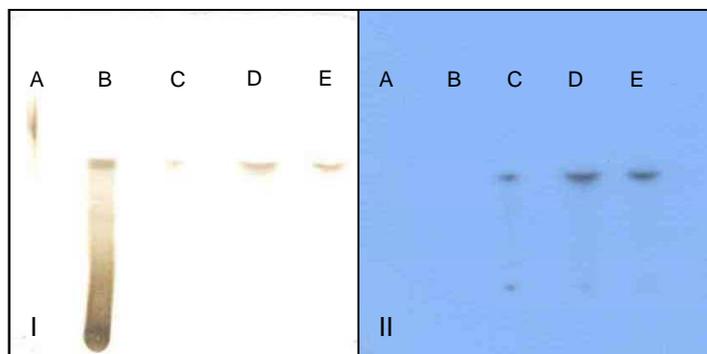


Fig. 38 – (I) TLC confirmando a síntese de hemina. A, protoporfirina IX; B, padrão de hemina; C,D,E, sínteses de hemina a partir de $FeCl_3$ e protoporfirina IX. (II) Exposição da placa de TLC sob um filme revelando a incorporação de Fe^{55} no grupo heme.

Seguindo uma linha experimental semelhante à delineada para a hemoglobina verificou-se a existência de uma maior captação de hemina a $37^{\circ}C$ do que a $4^{\circ}C$ (Figura 39) indicando a existência de um processo de transporte activo dependente da temperatura.

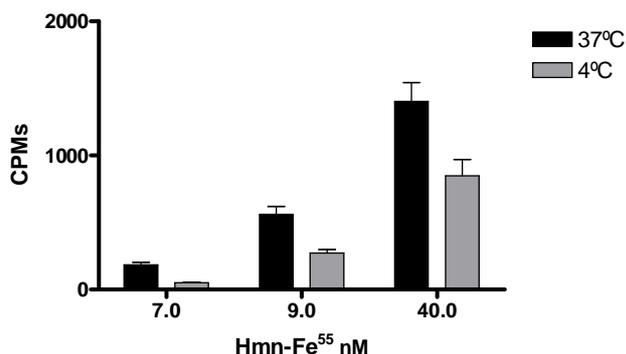


Fig. 39 – Captação de Fe⁵⁵ pelas formas amastigotas ao fim de 3 horas de cultura, em MAA, a 4°C e 37°C na presença de quantidades crescentes de hemina-Fe⁵⁵. Experiência realizada em triplicado.

Continuando a análise preliminar sobre o processo de captação, verificou-se através de estudos de competição (Figura 40) que deverá existir uma molécula à superfície do parasita, específica para a hemina, que é competida pela protoporfirina IX. Os resultados apresentados nas figuras 39 e 40 indicam a existência de um receptor específico para a hemina.

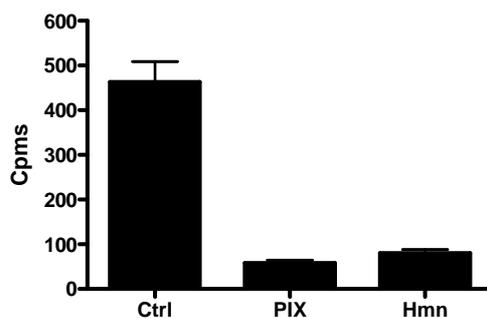


Fig. 40 – Ligação de Fe⁵⁵ proveniente da hemina às formas amastigotas ao fim de 3 horas a 4°C num ensaio de competição, utilizando 0,05 µM de hemina-Fe⁵⁵, juntamente com 1 µM de: protoporfirina, (PIX) e hemina, (Hmn). Como controlo situação (Ctrl), não existiu competidor. Experiência realizada em triplicado.

Conforme já foi referido, o cálculo da Kd implica que ligando e ligado estejam em equilíbrio. Assim, de uma maneira semelhante ao realizado para a hemoglobina,

determinou-se o tempo que uma quantidade de hemina demora a atingir o equilíbrio com os receptores (Figura 41).

Para determinar a K_d recorreu-se a um ensaio de saturação. Este tipo de ensaio tem pressupostos semelhantes aos descritos para a hemoglobina. Os estudos de saturação, (Figura 40), revelaram um equilíbrio rapidamente atingido.

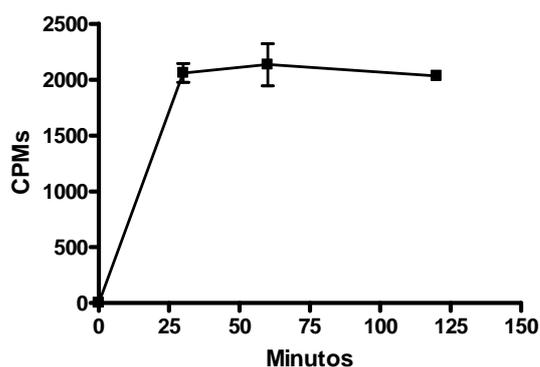


Fig. 41 - Ligação de 50 nM de hemina- Fe^{55} ao parasita em função do tempo a 4°C. Experiência realizada em triplicado.

As K_d obtidas nos ensaios de saturação, (Figura 42), foram muito consistentes e situaram-se entre os 0,02 e 0,05 nM.

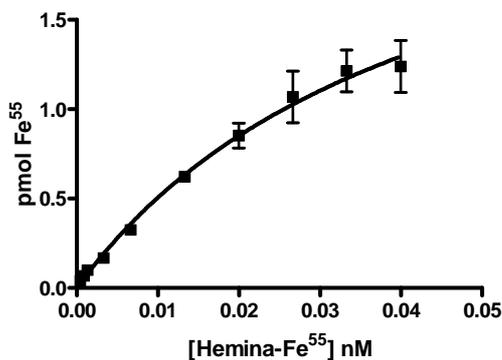


Fig. 42 - Ligação de quantidades crescentes de hemina- Fe^{55} ao parasita, ao fim de 3 horas a 4°C. A constante de dissociação, K_d , determinada por regressão linear utilizando o *Graphpad da Prism* foi de 0.044 nM. Experiência representativa de quatro ensaios realizados em triplicado.

A determinação da constante de captação da Fe^{55} -hemina seria o passo seguinte, porém, mais uma vez, não foi possível a sua determinação porque foi impossível atingir a velocidade máxima de captação. Dados preliminares indicam que a captação decorre linearmente até concentrações na ordem dos 40 pM (Figura 43).

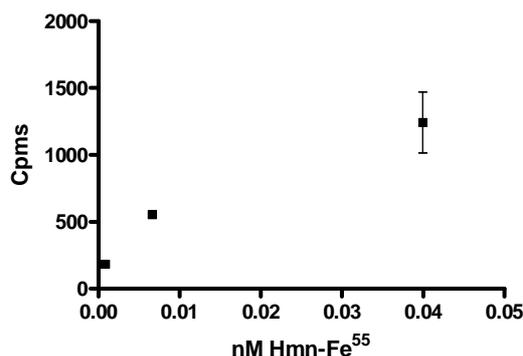


Fig. 43 – Captação de Fe^{55} pelo parasita após incubação durante 3 horas a 37°C , com quantidades crescentes de hemina- Fe^{55} .

6. Estudo para a determinação das condições de “starving” de ferro.

Em princípio as formas amastigotas induzem moléculas envolvidas na captação do ferro mediante a concentração deste. Consequentemente o desenvolvimento das condições de “starving” do ferro é de grande importância para o estudo do metabolismo do ferro nestes parasitas. A definição destas condições permitiria estudar, por exemplo, a regulação de alguns dos receptores envolvidos e até definir estratégias para o seu isolamento por comparação da expressão proteica de formas amastigotas crescidas na ausência e em excesso de ferro.

Para definir as condições de “starving” usamos um quelante permeável para o ferro, o 2-2'-dipiridil (DPD). Conforme indicado na figura 43 foi feita uma “titulação biológica” de modo a determinar qual a concentração de DPD que inibe o crescimento dos parasitas. Verificou-se que $100\ \mu\text{M}$ de DPD é suficiente para o conseguir. Esta ausência de crescimento com $100\ \mu\text{M}$ de DPD foi reversível pela colocação destes parasitas em meio novo, indicando que a ausência de crescimento não era devido à toxicidade do DPD mas sim devido à restrição de nutrientes. A viabilidade destes parasitas sujeitos a estas

concentrações de DPD foi determinada por citometria de fluxo. O contacto com o DPD não revelou citotoxicidade nos intervalos de tempo do ensaio para as concentrações de 100 μM e 50 μM . Consequentemente da análise da figura 44 parece que uma concentração de 100 μM de dipiridil é suficiente para inibir o crescimento dos parasitas.

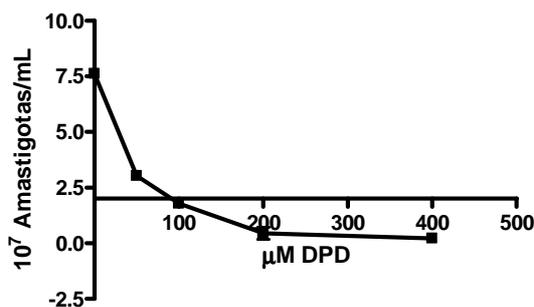


Fig. 44 – Número de formas amastigotas em cultura após 48 horas de incubação a 37°C, com quantidades crescentes de dipiridil (DPD), em MAA20. O eixo das abcissas intercepta o eixo das ordenadas na quantidade inicial de formas amastigotas em cultura, sendo que os valores abaixo do eixo das abcissas representam uma diminuição do número de amastigotas. Experiência representativa de três ensaios realizados em duplicado.

Para verificar se a captação do ferro era regulada por uma situação de “starvation” determinou-se a captação do ferro em parasitas cultivados na presença de DPD durante 6 e 24 horas (Figura 45). A incubação dos parasitas, durante 24 horas, com DPD, nas concentrações de 50 e 100 μM , parece induzir um aumento, de cerca de 2 vezes, da captação do Fe^{55} proveniente do Fe-NTA e do FeCl_3 . Para a concentração de 200 μM de DPD não foi detectado qualquer aumento da captação das diferentes fontes de ferro pelos parasitas. A incubação durante 5 horas não parece ser capaz de induzir um aumento de captação das diferentes fontes de ferro testadas. Estes resultados foram consistentes nas duas experiências realizadas. No que respeita à hemina, os resultados não foram consistentes, parece não existir indução significativa da captação da hemina.

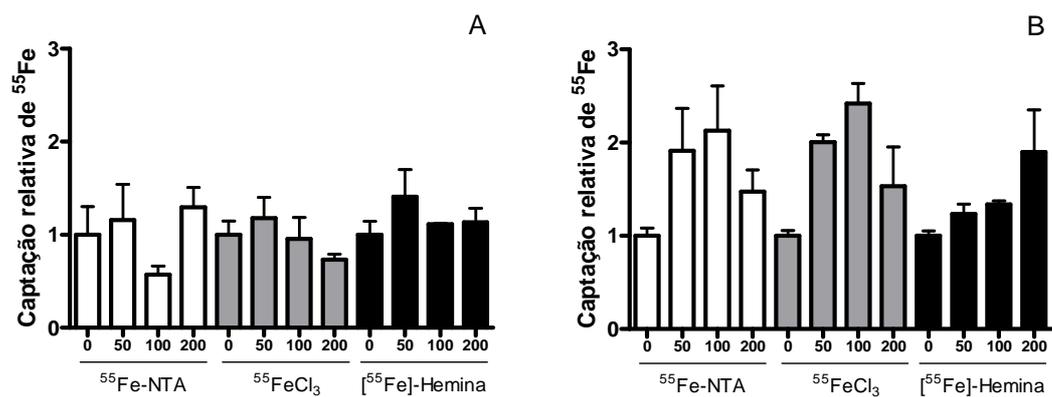


Fig. 45 - Captção de Fe^{55} após incubação de parasitas a 37°C com diferentes concentrações de DPD, (valores no eixo das abcissas) durante 5 horas (A) e 24 horas (B). Após os tempos de contacto com o DPD os parasitas foram incubados durante 3 horas em MAA na presença de $0,74 \text{ nmol}$ das diferentes fontes de ferro. Experiência representativa de dois ensaios realizados em triplicada.

Discussão

O estudo desenvolvido sobre a captação de ferro pela forma amastigota de *L. infantum*, teve como pressuposto essencial o facto desta forma amastigota ter na disponibilidade do ferro um elemento limitante para o crescimento. Assim, a abordagem escolhida para determinar as fontes de ferro utilizáveis por amastigotas de *L. infantum* foi a complementação do meio base de crescimento das formas amastigotas (o meio MAA) com componentes do soro bovino fetal (SBF) de peso molecular inferior a 10 kDa, sendo este novo meio designado de meio Fi. A principal característica deste meio é o facto do seu conteúdo em ferro ser substancialmente menor uma vez que se removeram por filtração cerca de 80% do conteúdo em ferro (Figura 14), essencialmente por eliminação da transferrina e da hemoglobina. O meio Fi, quando utilizado como meio de cultura, foi incapaz de promover o crescimento das formas amastigotas (Figura 15). Estes resultados são semelhantes aos obtidos nas formas promastigotas de *L. chagasi* [26] onde, utilizando também um meio depletado de ferro, se observou que os parasitas eram incapazes de crescer, demonstrando o carácter essencial do ferro para o crescimento dos parasitas em cultura. Os resultados apresentados nas figuras 16, 17 e 18 provam que esta ausência de crescimento não é devida à falta de componentes proteicos (Figura 16), nem à ausência do grupo heme (Figuras 17 e 18). Só existe crescimento mediante a adição de uma fonte de ferro, hémica ou não hémica (Figura 17).

A ausência do grupo heme no meio Fi foi um elemento perturbador em virtude da conhecida incapacidade dos tripanossomatídeos de sintetizarem este grupo (Figura 13). Este problema normalmente é resolvido suplementando os parasitas em cultura com hemina, porém tal não poderia ser feito neste ensaio pois a hemina é uma fonte de ferro. Tendo em conta que os parasitas são capazes de sintetizar o grupo heme desde que obtenham protoporfirina IX, uma vez que possuem a ferroquelatase necessária para a incorporação do ferro no macrociclo, a solução passou pela incorporação de protoporfirina IX nas culturas, algo já descrito na literatura em promastigotas [35]. Infelizmente a protoporfirina IX tem propriedades antileishmanicidas em virtude de gerar radicais livres altamente tóxicos para os organismos [35, 36]. Assim, a suplementação do meio com protoporfirina IX, nos mesmos níveis usados para a hemina, não foi possível. Porém, a

suplementação do meio Fi com protoporfirina IX em concentrações entre os 0,4 e os 3,5 μM (Figura 18) teve um efeito positivo no crescimento parasitário com fontes de ferro não hémicas. Uma outra consequência resultante da ausência do grupo heme nas culturas em meio Fi foi a incapacidade de as manter indefinidamente quando a fonte de ferro utilizada para suplementar as culturas foi ferro inorgânico. Por outras palavras, a suplementação do meio Fi com fontes hémicas permitiu a manutenção indefinida das culturas (Figura 20). O mesmo não se verificou utilizando fontes não hémicas. Contudo, para fontes não hémicas, a adição de 1,8 μM de protoporfirina IX foi suficiente para suprir as necessidades parasitárias ao longo de várias passagens. Curiosamente, 0,8 μM de protoporfirina IX apesar de ter permitido um crescimento idêntico ao longo de uma repicagem (Figuras 18 e 19), não permitiu a manutenção das culturas ao longo do tempo (dados não incluídos), sendo os parasitas incapazes de sobreviver em repicagens sucessivas. É possível especular sobre a possibilidade de algum tipo de armazenamento do grupo heme. A existência de reservas do grupo heme permitiria a sobrevivência do parasita durante algum tempo com um fornecimento limitado de heme. Está descrita uma proteína, em *Vibrio cholerae*, designada por HutZ que parece funcionar como um elemento armazenador do grupo heme [37]. Seria interessante verificar com maior detalhe o destino do grupo heme na *Leishmania* pois pouco é conhecido acerca do processamento do grupo heme nos parasitas. Heme livre não existe em grandes quantidades uma vez que, de modo semelhante à protoporfirina IX, pode entrar em reacções radicalares. Assim, o destino mais provável será a sua utilização imediata ou a degradação por acção de uma enzima pertencente à família das heme-oxigenases. Neste campo o trabalho mais relevante foi a caracterização bioquímica de uma heme-oxigenase nas formas promastigotas de *L. donovani* [24].

Os ensaios de complementação do meio Fi com diferentes fontes de ferro, (Figura 21), demonstraram que as formas amastigotas podem crescer meio suplementado com fontes de ferro hémicas como a hemina e a hemoglobina, e fontes não hémicas, como o FeCl_3 ou o ferro associado ao nitrilotioacetato (Fe-NTA). As fontes não hémicas promovem o crescimento parasitário a um nível inferior. Outras fontes de ferro como a transferrina, a lactoferrina ou a ferritina foram incapazes de induzir o crescimento dos amastigotas em níveis significativos. Qual o significado destes resultados?

Relativamente às fontes não hémicas o resultado mais surpreendente é a ausência

de crescimento associado à transferrina e à lactoferrina visível nas figuras 21 e 23. Estudos em formas promastigotas indicam que estas proteínas podem ser utilizadas como fontes de ferro [26, 29]. Em 1992 foi mesmo isolado um candidato a receptor de transferrina [28], no entanto estudos subsequentes demonstraram não ser específico para a transferrina [29]. Em 1998 foram caracterizados bioquimicamente, por estudos de competição, possíveis receptores para a lactoferrina e a transferrina [27]. No entanto, estes nunca foram identificados, ao contrário do que acontece em outros tripanossomatídeos como *Trypanosoma brucei*, onde já foi identificado e extensivamente caracterizado o receptor para a transferrina [38, 39] [40]. Em 2002 foi descrito um modelo alternativo para a captação do ferro a partir da transferrina/lactoferrina nas formas promastigotas de *L. chagasi* [29]. Este modelo pressupõe, não a internalização de transferrina/lactoferrina, mas sim a remoção do ferro que lhe está associado por acção de hipotéticas reductases de superfície/excretadas. O crescimento das formas promastigotas e não de amastigotas em meio Fi suplementado com transferrina ou lactoferrina poderia ser um indicador de uma captação diferencial do ferro, isto é, dependente do estágio do parasita. Contudo, tal não foi possível pois o meio Fi contém ferro suficiente para promover o crescimento da forma promastigota em cultura. Estes resultados indicam, como já foi referido, uma utilização diferencial das diferentes fontes de ferro pela *Leishmania*. Na sua forma amastigota seria incapaz de utilizar transferrina e lactoferrina como fontes de ferro, ao contrário do que aconteceria na forma promastigota. Estaríamos então perante a expressão estágio-dependente de um conjunto de genes associados à captação de transferrina e lactoferrina que não seriam expressos na forma amastigota. Este tipo de genes com expressão diferencial não é novidade em *Leishmania* pois existem vários genes expressos de uma forma dependente do estágio de desenvolvimento da *Leishmania* tal como as proteínas A2 ou a HSP100 caracterizadas como importantes factores de virulência [41], apenas expressas na forma amastigota. Biologicamente, poderão a transferrina e a lactoferrina desempenhar um papel significativo como fontes de ferro? Estará acessível ao parasita? Na forma promastigota, dentro do vector insecto, o parasita terá como uma das principais fontes de ferro a transferrina, abundante no sangue do qual a mosca da areia se alimenta. No hospedeiro vertebrado, para além da transferrina temos também a lactoferrina como fonte de ferro significativa uma vez que pode ser produzida nos neutrófilos, uma das primeiras células fagocíticas a serem recrutadas para o local da infecção, sendo por isso

capazes de funcionar como hospedeiro primário para a forma promastigota. É de realçar, porém, que as formas promastigotas não se diferenciam em formas amastigotas no interior dos neutrófilos [42]. Ao contrário do que acontece no interior dos neutrófilos, no interior dos macrófagos não parecem existir fontes abundantes de lactoferrina, no entanto existe transferrina que é activamente transportada para o interior do macrófago. Um artigo faz referência à internalização de transferrina de um modo anormal pelos macrófagos infectados com *Leishmania*. Assim, a não utilização da lactoferrina pela forma amastigota, parece não ser completamente descabida após se analisar a sua disponibilidade nos diferentes estádios. A não utilização da transferrina também pode ser facilmente explicável na medida que a forma amastigota não se encontra livre no citoplasma dos macrófagos, encontra-se nos fagolisossomas dos macrófagos. No interior dos fagolisossomas parasitados estão descritos valores de pH na ordem de 5,4. A este pH o ferro dissocia-se espontaneamente da transferrina ficando o ferro disponível para ser captado. Assim sendo, a transferrina seria apenas utilizada como fonte indirecta de ferro. O pH das culturas das formas amastigotas varia ao longo do tempo em função da modulação do meio resultante da actividade dos parasitas (Figura 24). No início da cultura, o pH é aproximadamente 6,4, a este pH o ferro está associado à transferrina, logo a transferrina não permite o crescimento dos parasitas. No fagolisossoma pode servir como fonte de ferro de uma maneira indirecta, pois, como já foi referido, no pH ácido do fagolisossoma o ferro dissocia-se da transferrina permitindo a captação de ferro na forma de ferro livre.

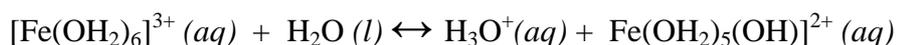
A possibilidade da existência de sideróferos em *Leishmania* já foi abordada em formas promastigotas [29], sem no entanto ter sido comprovada a sua existência. Além disso, a susceptibilidade da *Leishmania* a agentes quelantes [43, 44], como a desferrioxamina (DFO), indicia não possuir mecanismos capazes de remover o ferro de agentes quelantes fortes.

A aquisição do ferro a partir do Fe-NTA, pressupõe a capacidade de remoção do ferro do NTA, pois o complexo Fe-NTA não atravessa a membrana celular. Esta remoção pode ser feita mediante a utilização de sideróferos, ou através da utilização de reductases.

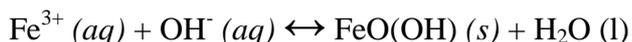
A presença de actividade de reductases foi detectada na forma amastigotas (Figura 26), sem atingir porém os níveis de actividade descritos por M. Wilson [29]. No entanto, este facto pode ser devido à não utilização de amastigotas colocados previamente numa situação de ausência de ferro, de modo a depletar as suas reservas de ferro (“starvation”).

Ainda assim, a redução do ferrocianato foi detectável, sendo mais intensa nas formas amastigotas.

O ferro iónico, como seria de esperar, também permitiu o crescimento do parasita (Figura 21). Está descrito que a forma promastigota é capaz de captar o ferro preferencialmente na sua forma reduzida [29], no entanto não foram detectadas diferenças significativas quando utilizado o Fe-NTA ou o FeCl₃ na presença de redutores ou oxidantes (Figura 28). No caso do FeCl₃ parece que tanto a oxidação como a redução do ferro aumentarem a sua captação, um achado que não é simples de explicar. É possível que tal seja devido ao facto da solubilidade do ferro variar em função do pH e do potencial electroquímico, E° , do meio. Ou seja, o FeCl₃ existe normalmente na forma de um sal hidratado, o FeCl₃.6H₂O, que em solução aquosa, dá origem a um catião hidratado incolor, o [Fe(OH₂)₆]³⁺, característico dos sais de ferro dissolvidos em água. Este é suficientemente polarizado para que as moléculas de água funcionem como bases, removendo protões do catião hidratado:



Eventualmente, num equilíbrio dependente do pH, teremos a formação de uma solução cada vez mais amarela, seguida pela formação de um precipitado cor de ferrugem com uma consistência gelatinosa, composto essencialmente por hidróxido de ferro, FeO(OH), de acordo com a equação:



O pH não é o único elemento a afectar a solubilidade do ferro, o E° também tem um papel importante como demonstrado no diagrama de Pourbaix, (Figura 46). Assim sendo, é possível que, no pH em se realizam os ensaios, entre 5 e 6, haja diferenças na quantidade de ferro biodisponível pois ter-se-á uma maior ou menor quantidade de hidróxidos de ferro consoante o E° . Logo um potencial negativo devido à acção de um redutor induz um aumento de Fe²⁺ (solúvel). Paradoxalmente o mesmo acontece quando se oxida o meio pois diminui-se a quantidade de hidróxidos de ferro, cuja estabilidade termodinâmica é desfavorecida por pH baixo e E° elevado, passando existir mais ferro solúvel na forma de catiões hidratados. Este facto explicaria o aumento da captação do ferro quando se utilizou o FeCl₃ como fonte de ferro (Figura 28), quer na presença de redutores quer de oxidantes. A diferença de captação seria explicada pela biodisponibilidade do ferro. Um mesmo nível de captação de Fe²⁺ ou Fe³⁺ é no entanto um pouco estranho e difícil de explicar

biologicamente. Estes resultados indicariam um mecanismo de captação indeferenciado para Fe^{2+} ou Fe^{3+} , talvez envolvendo reductases e/ou transportadores. Mecanismos de redução para a captação de ferro já foram amplamente descritos em vários organismos [45-47]. No caso do Fe-NTA a dependência da captação em função da temperatura, (Figura 25), é indicativo de um fenómeno activo de transporte, envolvendo provavelmente uma reductase e um transportador cuja actividade será diminuída pela temperatura. Assim sendo, a captação de ferro iónico envolveria um modelo semelhante ao proposto por Wilson *et al* [29] para captação de ferro, com uma reductase, possivelmente de membrana, associada a um transportador. Se o evento de redução mediado por uma reductase for muito rápido, o passo limitante no transporte seria a capacidade do transportador em fazer passar os iões Fe^{2+} pela membrana. Assim, independentemente de se ter predominantemente Fe^{2+} ou Fe^{3+} no meio, ter-se-ia sempre o transporte da mesma quantidade de átomos de ferro. Se este modelo for verdadeiro e o mecanismo para a captação do ferro for o mesmo para o ferro iónico e para o Fe-NTA, poderíamos, á primeira vista estar perante uma contradição uma vez que o crescimento dos parasitas não é maior na presença de Fe-NTA do que de FeCl_3 , (Figuras 21 e 22). Contudo, deve-se ter em conta um facto muito importante já referido nesta discussão; a questão da biodisponibilidade do ferro. A quantidade de FeCl_3 adicionada nos ensaios de crescimento foi de $8 \mu\text{M}$, no entanto a solubilidade estimada do FeCl_3 é na ordem dos 10^{-9}M (nM). Assim o menor crescimento obtido com o FeCl_3 deverá ser simplesmente devido a uma menor quantidade de ferro biodisponível. É importante recordar que ao ligação do NTA ao ferro solubiliza-o, logo a quantidade de ferro adicionada ao NTA será a quantidade de ferro presente no ensaio.

A comparação feita na figura 22 demonstra que as fontes não hémicas parecem necessitar de quantidades muito superiores para suster níveis de crescimento comparáveis aos obtidos com fontes hémicas. Isto pode ser devido a uma multiplicidade de factores que o nosso estudo não permitiu responder, factores estes relacionados com o tipo de transporte, a velocidade de internalização, afinidade e o número de receptores.

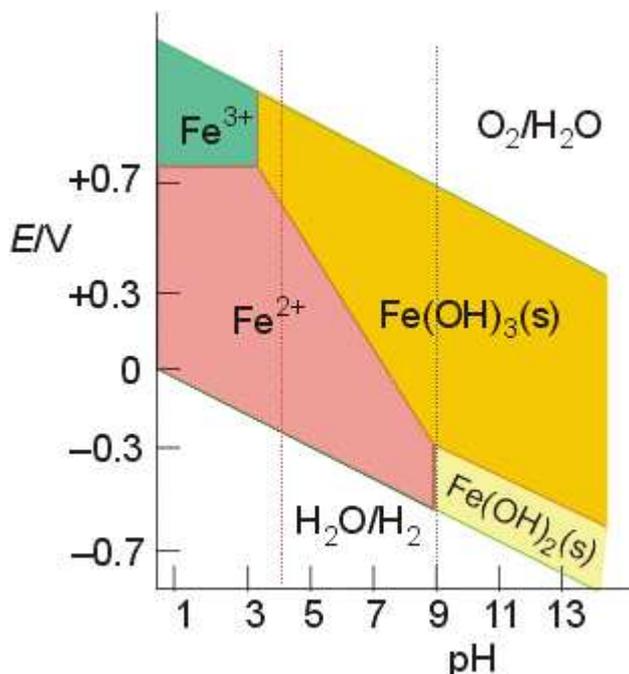


Fig. 46 – Diagrama de Pourbaix simplificado para as espécies de ferro existentes em solução. Este diagrama apresenta as espécies termodinamicamente mais estáveis em função do pH e do $E^\circ(E/V)$ do meio. As linhas verticais, paralelas ao eixo das ordenadas, que separam as diferentes espécies representam equilíbrios dependentes do pH, as restantes linhas do diagrama entre as diferentes espécies de ferro representam equilíbrios redox. As linhas verdes marcam os limites de E° onde é possível oxidar e reduzir o ferro a um determinado pH. A E° muito elevados o oxigénio será dismutado em água, a potenciais muito reduzidos a água será dismutada em hidrogénio.

Relativamente às fontes hémicas a utilização mais eficiente da a hemina e da hemoglobina como fontes de ferro, deve estar relacionada com o facto de funcionarem também como fontes do grupo heme. Desta forma, aliviam a falta do grupo heme resultante da incapacidade destes parasitas para o sintetizarem. Relativamente à hemoglobina, já existem estudos bastante avançados sobre a sua utilização nas formas promastigotas. Foi descrita e isolada, em *L. donovani*, uma proteína de 46 kDa que parece funcionar como um receptor para a hemoglobina [32, 33, 48]. Por isso não foi surpresa a capacidade do parasita para crescer com esta fonte de ferro. Os resultados obtidos indicam a existência de um receptor específico (figuras 30, 31, 32, 33, 34). É visível a ocorrência da captação da hemoglobina dependente da temperatura (Figura 30). A ligação da hemoglobina ao parasita não é competida por hemina nem outras proteínas heterologas, (Figura 31). A determinação da Kd (Figura 34) revelou, porém, uma ligação de baixa afinidade com uma constante entre os 3 e os 35 μM (a Kd determinada para o receptor da

hemoglobina de *L. donovani* foi de 0,6 μM [33]). A captação de hemoglobina a 37°C, visível na figura 35 revelou uma captação crescente em função da concentração, não tendo sido atingido um patamar constante de captação indicativo da saturação dos receptores. Por este motivo, não foi possível determinar a constante de captação K_m . Curiosamente o aumento da captação não foi linear para todas as gamas de concentrações testadas. Até 200 μM observou-se uma captação distinta da obtida para concentrações superiores. A figura 35 mostra que as rectas traçadas no gráfico de captação são distintas para os dois conjuntos de concentrações. Este resultado permite especular sobre a existência de dois tipos de receptores para a hemoglobina. Porém, não existe nenhum estudo sobre receptores para a hemoglobina cuja expressão fosse induzida pela presença de grandes quantidades de hemoglobina. Mecanismos indutíveis para a captação de ferro estão descritos para outros organismos. Um exemplo paradigmático é o sistema de transporte de ferro, em *Saccharomyces cerevisiae*, de alta (K_d , 15 nM) e baixa afinidade (K_d , 40 μM) cuja expressão é dependente da abundância de ferro [17, 49, 50]. Assim, não seria impossível ponderar a possibilidade de existirem receptores inductíveis nas formas amastigotas de *L. infantum*. Esta possibilidade vai ser testada por ensaios de ligação, a 4°C, colocando parasitas a crescer com diferentes quantidades de hemoglobina (experiência ainda em fase de planeamento).

Estudos em *L. donovani* descrevem também um “turnover” rápido de elementos iodados provenientes da hemoglobina, como resultado de um processo de degradação intracelular [33]. Para confirmar este facto tentou-se detectar a presença de elementos iodados resultantes da degradação da hemoglobina nos sobrenadantes das culturas após incubação com hemoglobina iodada. Os nossos resultados indicam contudo níveis de degradação pouco assinaláveis (Figura 37). Apesar de um pequeno aumento de produtos iodados de baixo peso molecular não parecem ser suficientes para influenciar a determinação do K_m . Uma degradação significativa influenciaria a determinação de um patamar de velocidade máxima que impossibilitaria a determinação do K_m uma vez que a hemoglobina iodada não é retida no parasita mas sim degradada e excretada para o exterior do parasita.

A capacidade para ligar o grupo heme já foi descrita em formas promastigotas de *L. mexicana*, sendo esta ligação dependente do estádio de desenvolvimento do parasita, isto é, promastigotas logarítmicos, em divisão activa, ligavam cerca de 10 vezes mais

hemina do que a forma estacionária [30]. De facto os nossos estudos cinéticos, preliminares ainda, confluem no sentido da possibilidade de existir um receptor na superfície do parasita envolvido na captação do grupo heme (Figuras 39,40, 42).

Assim, existe uma captação do grupo heme dependente da temperatura, visível na figura 39, indicativo de um processo activo de captação. A ligação à superfície do parasita parece ser específica e competida por protoporfirina IX (Figura 40). Estes dados são concordantes com os obtidos por Garbraith [30]. A constante de afinidade, K_d , determinada (Figura 42), assumiu valores entre os 0,02 e os 0,05 nM, (0,003 nM determinado por Garbraith em 1988, [30]) fornecendo indícios da existência de uma molécula de alta afinidade para a hemina. A existência deste receptor de alta afinidade será um indicador da importância que tem a captação do grupo heme neste organismo. Convém ainda realçar que o heme pode atravessar membranas celulares por difusão passiva, no entanto este facto não terá grande relevância fisiológica pois nenhum organismo depende unicamente dele. Todos os organismos que utilizam o grupo heme como fonte de ferro adquirem o heme, ou as proteínas a ele associadas, mediante processos específicos (receptores, hemóforos).

São imensas as referências a mecanismos indutíveis por situações ambientais. Um caso paradigmático já aqui referido e alvo de extensivo estudo é o sistema de captação do ferro envolvendo reductases em *S. cerevisiae*. No entanto, o estudo deste tipo de mecanismos pressupunha a obtenção de condições de “starvation” para o ferro. A abordagem escolhida para tentar criar uma situação de “starvation” foi a utilização de um quelante permeável o 2-2'-dipiridil, (DPD). Este demonstrou ser capaz de inibir o crescimento das formas amastigotas de *L. infantum* (Figura 44) de uma maneira dependente da concentração. Assim, o contacto durante 24 horas com 50 ou 100 μM de DPD parece induzir a captação do ferro iónico e associado a Fe-NTA, (Figura 45), sendo provavelmente possível utilizar este processo em estudos futuros que envolvam a caracterização de elementos indutíveis em situações de “starvation”. Numa experiência recentemente realizada (dados não incluídos) foi possível reverter o efeito do DPD utilizando as mesmas fontes de ferro que permitiam o crescimento, comprovando mais uma vez a sua utilização pela forma amastigota.

Qual o significado biológico dos resultados obtidos?

Os macrófagos, são reconhecidamente células importantes envolvidas no processo

de remoção de eritrócitos, infectados ou não funcionais, da corrente sanguínea, tendo um papel significativo na reciclagem da hemoglobina. Assim não será difícil de conjecturar que um macrófago poderia ter no interior do mesmo fagolisossoma *Leishmania* e eritrócitos, apesar de Veras *et al* referir que não detectou tal co-localização [51]. É de referir porém, relativamente a este artigo, que foram utilizados eritrócitos fixados e não eritrócitos que tivessem numa situação de apoptose natural. Por isso as vias do processamento eritrocítico podem não ser exactamente as mesmas. Se coexistissem no mesmo fagolisossoma eritrócitos (ou produtos da degradação dos eritrócitos) e *Leishmania* estariam satisfeitos os requisitos para satisfazer as necessidades metabólicas do parasita. Como resultado da degradação dos eritrócitos teríamos uma abundante fonte de hemoglobina, de grupo heme e de ferro livre. A possibilidade de subversão do transporte de transferrina para os fagossomas de macrófagos parasitados [40], também contribuiria para aumentar a pool de ferro disponível pois a transferrina no ambiente acídico do fagolisossoma dissocia-se espontaneamente do ferro, fornecendo ferro iónico ao parasita. Obviamente este é apenas um cenário hipotético. Porém existem dois factos a ter em conta que parecem contribuir para este modelo: em primeiro a *Leishmania* é um patógeno de sucesso, infectando vertebrados há milhões de anos por isso é capaz de captar ferro (e os restantes nutrientes que necessita) a partir das fontes disponíveis no seu hospedeiro; segundo, *Leishmania* perdeu a capacidade de sintetizar o grupo heme, o que indica que o pode captar com facilidade a partir do meio.

Na forma promastigota os nutrientes são obtidos a partir das refeições sanguíneas da mosca. Não é difícil imaginar a captação do grupo heme proveniente de eritrócitos degradados durante o processo digestivo do insecto. Existe mesmo um artigo atribuindo propriedades hemolíticas às formas promastigotas de *L. donovani* [52]. Mas e na forma amastigota? De onde vem o grupo heme? A fonte de heme mais óbvia seriam os eritrócitos, porém não está descrito que a *Leishmania* infecte os eritrócitos dos mamíferos, (existe um caso de um réptil sul americano cujos eritrócitos estavam infectados por uma nova espécie de *Leishmania*, *Leishmania zuckermani*, [53]). Assim os macrófagos deverão ter fontes de grupo heme abundantes e disponíveis daí o modelo proposto. Um dado adicional a reforçar esta teoria é que grandes quantidades de heme parecem ser um dos sinais importantes para o processo de diferenciação, *in vitro* e *in situ*, da forma promastigota para forma amastigota [54]. Uma vez que *in vivo* a diferenciação ocorre,

principalmente, no interior de macrófagos, será possível especular que de facto o grupo heme se encontra disponível nos macrófagos.

Considerações finais

Os estudos realizados permitem definir como principais fontes de ferro utilizáveis pelo parasita na sua forma amastigota, a hemoglobina, o grupo heme, o ferro iónico livre ou associado a quelantes de baixa afinidade como o nitrilotriacetato. A ferritina, a transferrina e a lactoferrina foram incapazes de promover o crescimento parasitário.

Estudos preliminares parecem indicar que a captação de ferro iónico livre ou associado a quelantes de baixo peso molecular será efectuada mediante a acção de redutases. No que diz respeito à captação de ferro a partir da hemina e da hemoglobina, tudo indica existirem, na forma amastigota de *L. infantum*, moléculas específicas associadas ao seu transporte, tendo sido descrito uma molécula, provavelmente um receptor, capaz de ligar a hemina com alta afinidade, e pelo menos um receptor de baixa afinidade para a hemoglobina.

Foram também dados os primeiros passos na optimização das condições de “starvation” de ferro utilizando o dipiridil.

Todo o trabalho desenvolvido durante este ano foi apenas parte de um trabalho mais envolvente que continua a decorrer, visando a caracterização de moléculas envolvidas na captação de ferro pelas formas amastigotas de *L. infantum*.

Referências bibliográficas

1. Cox FE. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev* 2003;16(1):595-612.
2. Roberts LJ, Handman E, Foote SJ, Science m, and the future: Leishmaniasis., 801-4. *B. BMJ* 2000;321(7264):801-4.
3. Almeida MCd, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98(7):861-70.
4. Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to Leishmania infection. *Indian J Med Res.* 2004;119(6):238-58.
5. Desjeux P. Information on the epidemiology and control of the leishmaniasis by country or territory. In: WHO ed, 1991:1-47.
6. Abranches P, Santos-Gomes GM, Campino L. Epidemiology of leishmaniasis in Portugal. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis* 1993(70):349-55.
7. Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R, Molina R, Moreno J. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(2):298-319.
8. Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H, Alexander J. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet Parasitol.* 1998;76:173-780.
9. Leng YJ. A review of kala-azar in China from 1949 to 1959. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1982;76((4)):531-7.
10. Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulalio MC, Sampaio DP, Badaro R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59((1)):53-7.
11. Chungue CN, Owate J, Pamba HO, Donno L. Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990;84(2):221-5.
12. Agrawal S, Rai M, Sundar S. Management of visceral leishmaniasis: Indian perspective. *J Postgrad Med.* 2005;51:53-7.
13. Chipperfield JR, Ratledge C. Salicylic acid is not a bacterial siderophore: a theoretical study. *Biometals* 2000;13(2):165-8.
14. Jurado RL. Iron, infections, and anemia of inflammation. *Clin infect Dis* 1997;25(4):888-95.
15. Ratledge C, Dover LG. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:881-941.
16. Brown JS, Holden DW. Iron acquisition by Gram-positive bacterial pathogens. *Microbes Infect.* 2002;4(11):1149-56.
17. Howard DH. Acquisition, Transport, and Storage of Iron by Pathogenic Fungi. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(3):394-404.
18. Wilson ME, Britigan BE. Iron Acquisition by Parasitic Protozoa. *Parasitol Today* 1998;14(9):348-53.
19. Park RY, Sun HY, Choi MH, Bai YH, Chung YY, Shin SH. Proteases of a *Bacillus subtilis* clinical isolate facilitate swarming and siderophore-mediated iron uptake via proteolytic cleavage of transferrin. *Pharm Bul.* 2006;29(4):850-3.
20. Schuster FL, Sullivan JJ. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clin*

- Microbiology Rev 2002;15(3):374-89.
21. KP KPC, Chang CS, Sassa S. Heme biosynthesis in bacterium-protozoan symbioses: enzymic defects in host hemoflagellates and complementary role of their intracellular symbiotes. PNAS 1975;72(8):2979-83.
 22. Sah JF, Ito H, Kolli BK, Peterson DA, Sassa S, Chang KP. Genetic rescue of *Leishmania* deficiency in porphyrin biosynthesis creates mutants suitable for analysis of cellular events in uroporphyrin and for photodynamic therapy. J Biol Chem. 2002;277(17):14902-9.
 23. Sagar R, Salotra P, Bhatnagar R, Datta K. L-alanine: 4,5-dioxovalerate transaminase in *Leishmania donovani* that differs from mammalian enzyme. Microbiol Res. 1995;150(4):419-23.
 24. Srivastava P, Sharma GD, Kamboj KK, Rastog AK, Pandey VC. Heme metabolism in promastigotes of *Leishmania donovani*. Mol Cell Biochem 1997;171(1-2):65-8.
 25. Salzman TA, Stella AM, Xifra EA, Battle AM, Docampo R, Stoppani AO. Porphyrin biosynthesis in parasitic hemoflagellates: functional and defective enzymes in *Trypanosoma cruzi*. Comp Biochem Physiol. 1982;72(4):663-7.
 26. Wilson ME, Vorhies RW, Andersen KA, Britigan BE. Acquisition of Iron from Transferrin and Lactoferrin by the Protozoan *Leishmania chagasi*. Infect Immun. 1994;62(8):3262-9.
 27. Britigan BE, Lewis TS, McCormick ML, Wilson ME. Evidence for the existence of a surface receptor for ferriclactoferrin and ferrictransferrin associated with the plasma membrane of the protozoan parasite *Leishmania donovani*. Adv Exp Med Biol. 1998;443:135-40.
 28. Voyiatzaki CS, Soteriadou KP. Identification and isolation of the *Leishmania* transferrin receptor. The Journal of biological chemistry 1992;267(13):9112-7.
 29. Wilson ME, Lewis TS, Miller MA, McCormick ML, Britigan BE. *Leishmania chagasi*: uptake of iron bound to lactoferrin or transferrin requires an iron reductase. Exp Parasitol 2002;100(3):196-207.
 30. Galbraith RA, McElrath MJ. Heme binding to *Leishmania mexicana amazonensis*. Mol Biochem Parasitol. 1988;29(1):47-53.
 31. Limoncu ME, Ozbilgin A, Balcioglu IC, Ozbel Y. Evaluation of three new culture media for the cultivation and isolation of *Leishmania* parasites. J Basic Microbiol. 2004;44(3):197-202.
 32. Krishnamurthy G, Vikram R, Singh SB, Patel N, Agarwal S, Mukhopadhyay G, Basu SK, Mukhopadhyay A. Hemoglobin receptor in *Leishmania* is a hexokinase located in the flagellar pocket. J Biol Chem. 2005;280(7):5884-491.
 33. Sengupta S, Tripathi J, Tandon R, Raje M, Roy RP, Basu SK, Mukhopadhyay A. Hemoglobin endocytosis in *Leishmania* is mediated through a 46-kDa protein located in the flagellar pocket. J Biol Chem. 1999;275(5):2758-65.
 34. Silva-Lopez RE, Coelho MG, Simone SGD. Characterization of an extracellular serine protease of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Parasitol. 2005;131(1):85-96.
 35. Chang CS, Chang KP. Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*. Mol Biochem Parasitol 1985;16(3):267-76.
 36. Malik Z, Djaldetti M. Cytotoxic effect of hemin and protoporphyrin on chronic lymphocytic leukemia lymphocytes. Exp Hematol. 1980(8):867-79.
 37. Wyckoff EE, Schmitt M, Wilks A, Payne SM. HutZ Is Required for Efficient Heme

- Utilization in *Vibrio cholerae*. J Bacteriol. 2004;186(13):4142-51.
38. Salmon D, Geuskens M, Hanocq F, Hanocq-Quertie J, Nolan D, Ruben L, Pays E. A novel heterodimeric transferrin receptor encoded by a pair of VSG expression site-associated genes in *T. brucei*. Cell 1994;78(1):75-86.
 39. Steverding D, Stierhof YD, Fuchs H, Tauber R, Overath P. Transferrin-binding protein complex is the receptor for transferrin uptake in *Trypanosoma brucei*. J Cell Biol. 1995;131(5):1173-82.
 40. Borges VM, Vannier-Santos MA, Souza Wd. Subverted transferrin trafficking in *Leishmania*-infected macrophages. Parasitol Res. 1998;84(10):811-22.
 41. Clos J, Klaholz L, Kroemer M, Krobitch S, Lindquist S. Heat shock protein 100 and the amastigote stage-specific A2 proteins of *Leishmania donovani*. Med Microbiol Immunol. 2001;190(1-2):47-50.
 42. Zandbergen Gv, 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. J Immunol 2004;173(11):6521-5.
 43. Mbatia PA, Abok K, Anjili CO, Orago AS, Kagai JM, Githure JI, Koech DK. Screening of metal ion chelators against *Leishmania donovani*-infected Syrian hamsters. Afr J Health Sci. 1995;2(1):223-7.
 44. Soteriadou K, Papavassiliou P, Voyiatzaki C, Boelaert J. Effect of iron chelation on the in-vitro growth of *Leishmania* promastigotes. J Antimicrobial Chemother 1995;35(1):23-9.
 45. Askwith CC, Silva Dd, Kaplan J. Molecular biology of iron acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol 1996;20(1):27-34.
 46. Coulanges V, Andre P, Ziegler O, Buchheit L, Vidon DJ, II, 2778–2785. Utilization of iron–catecholamine complexes involving ferric reductase activity in *Listeria monocytogenes*. Infect Immun 1997;65(7):2778-85.
 47. Morrissey JA, Williams PH, Cashmore AM. *Candida albicans* has a cell-associated ferric reductase activity which is regulated in response to levels of iron and copper. Microbiol 1996;142(3):485-92.
 48. Singh SB, Tandon R, Krishnamurthy G, Vikram R, Sharma N, Basu SK, Mukhopadhyay A. Rab5-mediated endosome-endosome fusion regulates hemoglobin endocytosis in *Leishmania donovani*. EMBO 2003;22(21):5712-22.
 49. Lesuisse E, Labbe P. Reductive and non-reductive mechanisms of iron assimilation by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Genl Microbiol 1989;135(2):257-63.
 50. Lesuisse E, Crichton RR, Labbe P. Iron-reductases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim Biophys Acta. 1990;1038(2):253-9.
 51. Veras PS, Chastellier Cd, Rabinovitch M. Transfer of zymosan (yeast cell walls) to the parasitophorous vacuoles of macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. J Exp Med. 1992;176(3):639-46.
 52. Chakravarty R, Sharma MC, Gupta AK, Prakash N, Saran R. *Leishmania donovani*: hemolytic activity of promastigotes. Exp Parasitol. 1994;78(3):253-8.
 53. Paperna I, Boulard Y, Hering-Hagenbeck SH, Landau I. Description and ultrastructure of *Leishmania zuckermani* n. sp. amastigotes detected within the erythrocytes of the South African gecko *Pachydactylus turneri* Gray, 1864. Parasite 2001;8(4):349-53.
 54. Pal JK, Joshi-Purandare M. Dose-dependent differential effect of hemin on protein synthesis and cell proliferation in *Leishmania donovani* promastigotes cultured in vitro. J Biosc. 2001;26(2):225-31.

