

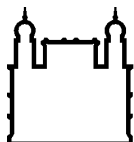
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária

**ANÁLISE DE DIFERENTES CEPAS DE *Leishmania (Leishmania) amazonensis* E
Leishmania (Viannia) braziliensis QUANTO A INFECTIVIDADE/VIRULÊNCIA E
PERFIL DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS PRODUZIDAS POR MACRÓFAGOS
MURINOS INFECTADOS**

MICHELLE MENEZES MACHADO

Rio de Janeiro
Maio de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

MICHELLE MENEZES MACHADO

Análise de diferentes cepas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* quanto a infectividade/virulência e perfil de citocinas e quimiocinas produzidas por macrófagos murinos infectados

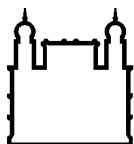
Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Coutinho Furtado de Mendonça

RIO DE JANEIRO

Maio de 2014

**FICHA CATALOGRÁFICA A SER ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DE MANGUINHOS
PARA A VERSÃO FINAL DA TESE.**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

MICHELLE MENEZES MACHADO

**ANÁLISE DE DIFERENTES CEPAS DE *Leishmania (Leishmania) amazonensis* E
Leishmania (Viannia) braziliensis QUANTO A INFECTIVIDADE/VIRULÊNCIA E
PERFIL DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS PRODUZIDAS POR MACRÓFAGOS
MURINOS INFECTADOS**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Sergio Coutinho Furtado de Mendonça

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Carlos Roberto Alves – Revisor (Fiocruz)

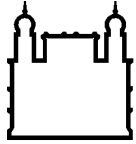
Prof. Dr. Adriano Gomes-Silva (Fiocruz)

Profa. Dra. Veronica Figueiredo do Amaral (UFF)

Profa. Dra. Celeste da Silva Freitas de Souza (Fiocruz)

Profa. Dra. Jussara Lagrota-Cândido (UFF)

Rio de Janeiro, 07 de maio de 2014.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

A Deus.

Agradecimentos

A Deus, acima de tudo.

Aos meus pais, Carlos Pereira Machado e Rosangela Quirino Machado e aos meus irmãos, Greicy Loren Quirino Machado e Carlos Pereira Machado Junior, por todo apoio, compreensão e estímulo.

À minha sobrinha e afilhada querida, a mais fofo do mundo, Isabella Quirino Machado Chagas por todo amor e pelo simples fato de existir.

Ao Prof. Dr. Sergio Coutinho Furtado de Mendonça, pela oportunidade, orientação e momentos de aprendizado.

Às Dra. Léa Cysne Finkelstein e Dra. Paula Mello de Luca, pela paciência, ensinamentos, incentivo e auxílio nos experimentos.

Às Dra. Raquel Ferreira Rodrigues, Dra. Leonor Laura Pinto Leon e Taiana Paes do Lab. de Bioquímica de Tripanosomatídeos – IOC, pelo auxílio na determinação da atividade de arginase e dosagem de óxido nítrico.

Ao Dr. Milton Ozório Moraes, Thiago Gomes de Toledo Pinto e Dr. Alexandre Almeida do Lab. de Hanseníase – IOC, pelo auxílio no desenvolvimento do PCR Multiplex em tempo real.

Ao Dr. Renato Porrozzi, Dra. Fernanda Nazaré Morgado, Barbara Neves dos Santos Faissal e Caroline Batista Marques da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz – CLIOC, pela caracterização, identificação e por terem disponibilizado as cepas utilizadas neste estudo.

À Dra. Maria de Fátima Madeira do Departamento de Micro-Imuno-Parasitologia – IPEC, que gentilmente nos cedeu a cepa MCAN/BR/1998/R619 utilizada neste estudo.

Ao Edson Fernandes de Assis da Plataforma de Luminex – IOC, pelo auxílio na realização do Luminex.

Ao Dr. Marcelo Ribeiro Alves do IPEC pelo auxílio na análise estatística.

Ao leleke André Alves Dias pela amizade, incentivo e auxílio na realização do Elisa.

À Dra. Joseli de Oliveira Ferreira (Lila), pelo apoio e palavras de motivação.

Aos companheiros de laboratório Job Inácio, Virgínia Araujo, Juan Camilo, Alinne Renzetti, Lana Bitencourt e Clarissa Ferreira pelo companheirismo e auxílio prestado em vários momentos no decorrer do mestrado.

Às grandes amigas Diana Mejido e Nilcéia Ramos por todo carinho, suporte e palavras de motivação, sem as quais, dificilmente, eu teria conseguido finalizar este trabalho.

Aos amigos de turma Geovane Lopes, Natália Lanzarini e Milene Yoko pelo companheirismo.

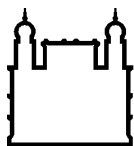
Aos meus amigos “farofeiros” (de vida) que nunca deixaram de estar ao meu lado, mesmo à distância, sempre no meu coração.

A todos àqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao Instituto Oswaldo Cruz – IOC e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

“Seja menos curioso sobre as pessoas e mais curioso sobre as ideias.”

Marie Curie



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ANÁLISE DE DIFERENTES CEPAS DE *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* QUANTO A INFECTIVIDADE/VIRULÊNCIA E PERFIL DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS PRODUZIDAS POR MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS

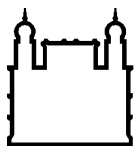
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Michelle Menezes Machado

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, clinicamente classificadas como leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral. As leishmanioses representam um grave problema de saúde pública no Brasil, onde já foram registradas em todos os estados. Considerando que os mecanismos pelos quais as diferentes espécies de *Leishmania* causam diferentes patologias ainda são amplamente desconhecidos, pretendeu-se caracterizar diferenças no perfil de citocinas e quimiocinas produzido por macrófagos murinos infectados com *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (Viannia) braziliensis*, espécies causadoras de leishmaniose tegumentar americana no Brasil e investigar uma possível relação entre os resultados deste trabalho e as características imunopatológicas das infecções com as espécies em estudo. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados com diferentes cepas de *L. (L.) amazonensis* e de *L. (V.) braziliensis*. A carga parasitária e a taxa de infecção de macrófagos foram determinadas através de microscopia ótica. As cepas de *L. (L.) amazonensis* apresentaram uma maior variabilidade intraespecífica do que as de *L. (V.) braziliensis*, porém sem diferença estatisticamente significativa. A produção de NO foi avaliada por meio da reação de Griess. Todas as cepas de *L. (L.) amazonensis* induziram a produção de NO, enquanto que apenas na infecção por uma cepa de *L. (V.) braziliensis* observaram-se níveis detectáveis de NO. Entretanto, esta aparente diferença também não foi estatisticamente significativa. A produção de ureia foi determinada através da ocorrência da reação de hidrólise de L-arginina pela enzima arginase. Observou-se que a produção de ureia nas culturas infectadas por *L. (V.) braziliensis* foi mais heterogênea do que nas infectadas por *L. (L.) amazonensis*. Observou-se também uma correlação inversa forte e significativa (Spearman $r = -0,8051$; $p = 0,0218$) entre os níveis de nitrito e de uréia caracterizando as duas vias de ativação macrofágica: clássica e alternativa, respectivamente. Citocinas e quimiocinas foram dosados nos sobrenadantes dos macrófagos infectados através da técnica de Luminex e a avaliação da expressão gênica destas citocinas e quimiocinas foi realizada por meio do PCR Multiplex em tempo real. Observaram-se importantes diferenças entre o perfil de citocinas e quimiocinas caracterizados através de Luminex e de PCR Multiplex em tempo real. Apesar disso, ambos os métodos mostraram níveis mais altos de citocinas e quimiocinas nas culturas infectadas com *L. (V.) braziliensis* em comparação às infectadas com *L. (L.) amazonensis*. Os resultados do Multiplex mostraram ausência

de diferença estatística entre os macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis* e o controle de macrófagos não infectados. Por outro lado, nas culturas infectadas por *L. (V.) braziliensis* houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão gênica das citocinas IL-1 α , IL-6, G-CSF e da enzima NOS, além do aumento sugestivo ($p < 0,1$) da expressão da citocina IL-10, da quimiocina CCL3 e dos receptores de quimiocinas CCR2 e CCR5. Concluiu-se, portanto, que a infecção por *L. (V.) braziliensis* modulou uma resposta predominantemente pró-inflamatória nos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, enquanto que não foi observada alteração na expressão de qualquer dos genes alvos do estudo na infecção com a espécie *L. (L.) amazonensis* em relação às culturas controle não infectadas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ANALYSIS OF DIFFERENT *Leishmania (Leishmania) amazonensis* AND *Leishmania (Viannia) braziliensis* STRAINS WITH REGARD TO INFECTIVITY/VIRULENCE AND PROFILE OF CYTOKINES AND CHEMOKINES PRODUCED BY INFECTED MURINE MACROPHAGES

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITIC BIOLOGY

Michelle Menezes Machado

Leishmaniasis is a group of diseases caused by various species of protozoa of the genus *Leishmania*, clinically classified as cutaneous leishmaniasis and visceral leishmaniasis. Leishmaniasis represents a serious public health problem in Brazil, where the disease has been registered in all states. Whereas the mechanisms by which the different species of *Leishmania* cause different diseases are still largely unknown, we sought to characterize differences in the profile of cytokines and chemokines produced by murine macrophages infected with *L. (Leishmania) amazonensis* and *L. (Viannia) braziliensis* species, both of them causing American cutaneous leishmaniasis in Brazil, and to investigate a possible relationship between the results of this work and the immunopathological characteristics of the infections with these species. Peritoneal macrophages from BALB/c mice were infected with different *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis* strains. The parasite load and the infection rate of macrophages were determined by optical microscopy. The *L. (L.) amazonensis* strains apparently showed greater intraspecific variability than those of *L. (V.) braziliensis*, although no statistically significant difference was found. NO production was assessed by the Griess reaction. All strains of *L. (L.) amazonensis* induced NO production while detectable NO levels were observed only in the infection by one strain of *L. (V.) braziliensis*. However, this apparent difference was not statistically significant. The urea production was determined by the occurrence of the hydrolysis reaction of L-arginine by the enzyme arginase. It was observed that urea production in cultures infected by *L. (V.) braziliensis* was more heterogeneous than in those infected by *L. (L.) amazonensis*. We also observed a strong and significant inverse correlation (Spearman $r = -0.8051$, $p = 0.0218$) between the levels of nitrite and urea featuring the two routes of macrophage activation: classical and alternative, respectively. Cytokines and chemokines were measured in the supernatants of infected macrophages through the Luminex technique and the assessment of gene expression of these cytokines and chemokines was performed using real-time PCR Multiplex. Important differences were observed between the profile of cytokines and chemokines revealed by Luminex and real-time PCR Multiplex. Nevertheless, both methods showed higher levels of cytokines and chemokines in cultures infected with *L. (V.) braziliensis* as compared to those infected with *L. (L.) amazonensis*. The Multiplex results showed no statistical difference between macrophages infected with *L. (L.) amazonensis* and uninfected macrophages control. On the other hand, in cultures infected with *L. (V.) braziliensis*

there was a significant increase ($p < 0.05$) of gene expression of IL-1 α , IL-6, G-CSF cytokines and NOS enzyme, and also a suggestive increase ($p < 0.1$) of the expression of the cytokine IL-10, the chemokine CCL3 and CCR2 and the chemokine receptors CCR5. Therefore, it was concluded that infection with *L. (V.) braziliensis* modulated a response predominantly proinflammatory in peritoneal macrophages from BALB/c mice, whereas no change was observed in the expression of any target gene in infections with *L. (L.) amazonensis* when compared to uninfected control cultures.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Gênero <i>Leishmania</i>	3
2.2 Ciclo biológico da <i>Leishmania sp.</i>	5
2.3 Ciclos de transmissão da <i>Leishmania sp.</i>	8
2.4 Associação entre espécie e forma clínica.....	9
2.5 Imunopatologia das leishmanioses	10
2.5.1 Resposta imune inata	10
2.5.1.1 Macrófagos	11
2.5.1.2 Células dendríticas	13
2.5.2 Resposta imune adaptativa	15
2.5.2.1 Respostas <i>Th1</i> e <i>Th2</i>	16
2.5.2.2 Outras subpopulações de células <i>T CD4⁺</i>	18
2.5.3 Citocinas e quimiocinas	20
2.6 Leishmaniose tegumentar americana (LTA)	22
2.7 Modelo murino de leishmaniose cutânea	24
3 JUSTIFICATIVA	27
4 OBJETIVOS	29
4.1 Objetivo Geral	29
4.2 Objetivos Específicos	29
5 MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1 Animais	30
5.2 Parasitos	30
5.3 Infecção e isolamento de <i>Leishmania sp.</i> de lesão de coxim plantar de hamster	31

5.4	Curvas de crescimento	31
5.5	Isolamento e infecção de macrófagos peritoneais de camundongos	32
5.6	Determinação da carga parasitária intracelular e da taxa de infecção de macrófagos	33
5.7	Avaliação da produção de NO.....	33
5.8	Determinação da atividade de arginase	34
5.9	Dosagem de citocinas e quimiocinas em sobrenadantes dos macrófagos infectados por Luminex.....	35
5.10	Dosagem de TNF- α por ELISA	35
5.11	PCR Multiplex em tempo real	36
5.11.1	Extração de RNA de lisados de macrófagos	36
5.11.2	Quantificação de ácidos nucleicos.....	37
5.11.3	Verificação da qualidade do RNA	37
5.11.4	Transcrição reversa	37
5.11.5	Desenho de iniciadores	37
5.11.6	Reação de PCR Multiplex em tempo real.....	38
5.11.7	Análise estatística dos dados de PCR Multiplex em tempo real.....	39
5.12	Análise estatística dos demais resultados	40
6	RESULTADOS	41
6.1	Isolamento de amastigotas de lesão de coxim plantar de hamster	41
6.2	Curvas de crescimento	42
6.3	Determinação da carga parasitária intracelular e taxa de infecção de macrófagos	44
6.4	Avaliação da produção de NO.....	54
6.5	Determinação da atividade de arginase	57
6.6	Dosagem de citocinas e quimiocinas em sobrenadantes dos macrófagos infectados por Luminex.....	61
6.7	Dosagem de TNF- α por ELISA	63
6.8	PCR Multiplex em tempo real	65
7	DISCUSSÃO	76

8	CONCLUSÕES	87
9	PERSPECTIVAS	88
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
	ANEXO A – CERTIFICADOS DE AUTENTICAÇÃO DAS CEPAS UTILIZADAS NO ESTUDO	105
	ANEXO B – CERTIFICADO DE AUTENTICAÇÃO DA CEPA IFLA/BR/1967/PH8 EM AMOSTRAS ISOLADAS DE HAMSTER E CAMUNDONGO	113
	APÊNDICE A – OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NO PCR MULTIPLEX EM TEMPO REAL	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Taxonomia da família Trypanosomatidae, com destaque para o gênero <i>Leishmania</i>	4
Figura 2.2. Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp.	7
Figura 2.3. Representação das vias de ativação de macrófagos: clássica e alternativa.....	12
Figura 5.1. Placa utilizada no PCR Multiplex em tempo real.....	39
Figura 6.1. Curvas de crescimento das cepas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e de <i>L. (L.) braziliensis</i> em meio Schneider.....	43
Figura 6.2. Estabelecimento da proporção de infecção de macrófagos..	45
Figura 6.3. Microscopia óptica de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados <i>in vitro</i> com cepas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e de <i>L. (V.) braziliensis</i>	46
Figura 6.4. Porcentagem de macrófagos infectados <i>in vitro</i> com cepas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e de <i>L. (V.) braziliensis</i>	48
Figura 6.5. Porcentagem de macrófagos infectados pelas espécies <i>L. (L.) amazonensis</i> (La) e <i>L. (V.) braziliensis</i> (Lb).	49
Figura 6.6. Carga parasitária intracelular de macrófagos infectados <i>in vitro</i> com cepas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e de <i>L. (V.) braziliensis</i>	50
Figura 6.7. Carga parasitária intracelular de macrófagos infectados pelas espécies <i>L. (L.) amazonensis</i> (La) e <i>L. (V.) braziliensis</i> (Lb).....	51
Figura 6.8. Diferença entre as cepas IFLA/BR/1967/PH8 isoladas de camundongo e de hamster.	53
Figura 6.9. Estabelecimento do tempo de infecção para dosagem de NO.....	55
Figura 6.10. Avaliação da produção de NO por meio da reação colorimétrica de Griess.....	56
Figura 6.11. Determinação da atividade de arginase das cepas em estudo.	58
Figura 6.12. Atividade de arginase das espécies em estudo.....	59
Figura 6.13. Análise de correlação entre nitrito e ureia.	60
Figura 6.14. Dosagem de citocinas e quimiocinas por Luminex.....	62
Figura 6.15. Dosagem de TNF- α 12 horas pós-infecção por ELISA e LUMINEX. ...	64
Figura 6.16. Valores normalizados da expressão gênica por PCR Multiplex em tempo real de CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5 em macrófagos murinos infectados por cepas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i>	66

Figura 6.17. Valores normalizados da expressão gênica por PCR Multiplex em tempo real de CCR2, CCR4, CCR5 e G-CSF em macrófagos murinos infectados por cepas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i>	67
Figura 6.18. Valores normalizados da expressão gênica por PCR Multiplex em tempo real de GM-CSF, IL-10, IL-12 e IL-15 em macrófagos murinos infectados por cepas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i>	68
Figura 6.19. Valores normalizados da expressão gênica por PCR Multiplex em tempo real de IL-18, IL-1 α , IL-1 β e IL-6 em macrófagos murinos infectados por cepas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i>	69
Figura 6.20. Valores normalizados da expressão gênica por PCR Multiplex em tempo real de NOS, TGF- β , TLR4 e TLR9 em macrófagos murinos infectados por cepas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i>	70
Figura 6.21. Valores normalizados da expressão gênica por PCR Multiplex em tempo real de TNF- α em macrófagos murinos infectados por cepas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i>	71
Figura 6.22. Valores normalizados da expressão gênica por PCR Multiplex em tempo real de CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCR2, CCR4 e CCR5 em macrófagos murinos infectados pelas espécies <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i>	73
Figura 6.23. Valores normalizados da expressão gênica por PCR Multiplex em tempo real de G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-1 α em macrófagos murinos infectados pelas espécies <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i>	74
Figura 6.24. Valores normalizados da expressão gênica por PCR Multiplex em tempo real de IL-1 β , IL-6, NOS, TGF- β , TLR4, TLR9 e TNF- α em macrófagos murinos infectados pelas espécies <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i>	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Ciclos de transmissão das leishmanioses no Brasil envolvendo diversidade de espécies de parasito, vetores e reservatórios.....	8
Tabela 2.2. Espécies de <i>Leishmania</i> encontradas em humanos e classificação de acordo com o subgênero e a preferência tecidual do protozoário (dermotrópica, mucotrópica ou viscerotrópica).....	9
Tabela 2.3. Descrição das principais citocinas de acordo com a sua fonte e modo de ação..	21
Tabela 6.1. Informações sobre as cepas obtidas da CLIOC referentes às espécies <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> , desenvolvimento de lesão (sim ou não) e sucesso do isolamento da cepa (sim ou não).	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

18S	RNA ribossomal 18S (S = unidade Svedberg)
BSA	Albumina do soro bovino (do inglês bovine serum albumin)
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CC	Subgrupo β -quimiocina
CCL	Quimiocina (classe C-C) ligante
CCRs	Receptores de quimiocinas CC
CD11c	Cadeia alfa X de integrina
CD4	Grupamento de diferenciação 4
CD8	Grupamento de diferenciação 8
CD25	Grupamento de diferenciação 25
cDNA	DNA complementar ao mRNA
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
Célula T	Linfócito derivado do timo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLIOC	Coleção de <i>Leishmania</i> do Instituto Oswaldo Cruz
CO ₂	Dióxido de carbono
CXC	Subgrupo α -quimiocina
CXCRs	Receptores de quimiocinas CXC
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Ensaio do imunossorvente ligado à enzima
FOXP3	Fator de transcrição nuclear “forkhead box” P3
g	Força centrífuga relativa à aceleração padrão de gravidade
GAPDH	Proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GIPL	Glicosilinositol fosfolípido
GM-CSF	Fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico

HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HO•	Radical hidroxila
HOCl ⁻	Hipoclorito
HPRT1	Hipoxantina fosforibosiltransferase 1
iDCs	Células dendríticas inflamatórias
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
IL-1 α	Interleucina-1 alfa
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-12 (p40)	Subunidade beta da Interleucina-12
IL-12 (p70)	Interleucina-12
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
KC	Citocina derivada do queratinócito
KCl	Cloreto de potássio
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
Linfócito B	Linfócito que amadurece na medula óssea
Linfócito T	Linfócito derivado do timo
LM	Leishmaniose mucosa
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
LVA	Leishmaniose visceral americana
<i>Lu.</i>	<i>Lutzomyia</i>
MCP-1	Proteína quimiotática de macrófagos 1
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa
MIP-1 β	Proteína inflamatória de macrófagos 1 beta
NCBI	National Center for Biotechnology Information
MnCl ₂	Cloreto de manganês
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NK	Células “natural killer”
NLRs	Receptores NOD-like

NO	Óxido nítrico receptores
NOD	Domínio de oligomerização do nucleotídeo
NOS	Óxido nítrico sintase
NO ₂ ⁻	Nitrito
O ₂ ^{-•}	Radical superóxido
Oligo(dT)	Oligo desoxitimidina trifosfato (oligonucleotídeo poli-T)
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pDCs	Células dendríticas plasmocitóides
pH	Potencial hidrogeniônico
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
p/v	Peso por volume
RAPD	Amplificação ao acaso de DNA polimórfico
RANTES	Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais
RF	“RNase Free Water” (água livre de RNase)
rGM-CSF	Fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos recombinante
RNA	Ácido ribonucléico
RNases	Ribonucleases
ROS	Espécies reativas ao oxigênio
RPL13	Proteína ribossomal L13
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Síntese de cDNA por uma transcriptase reversa, seguida de PCR
SFB	Soro fetal bovino
TGF-β	Fator de crescimento do tipo beta
Th0	Células T naïve
Th1	Célula T auxiliar subpopulação 1
Th2	Célula T auxiliar subpopulação 2
TLRs	Receptores Toll-like
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
Treg	Células T regulatórias
Tris-HCl	Tris hidrocloreto
V.	Subgênero <i>Viannia</i>

1. INTRODUÇÃO

O termo leishmaniose se refere a um grupo de doenças causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, clinicamente classificadas como leishmaniose tegumentar, que causa lesões na pele ou mucosa, e visceral, potencialmente fatal e caracterizada pelo parasitismo de órgãos internos ricos em células fagocitárias mononucleares (Murray *et al.*, 2005).

A leishmaniose tegumentar é uma doença infecciosa, não contagiosa, que acomete pele e mucosas. A infecção pode ser assintomática ou sintomática em pacientes com diferentes graus de suscetibilidade. Dependendo da espécie de *Leishmania* e da resposta imune do indivíduo infectado, pode-se desenvolver um espectro de formas clínicas, representando diferentes padrões imunopatológicos: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucosa (LM) (Lainson e Shaw, 1998; Silveira; Lainson; Corbett, 2004).

A leishmaniose visceral é uma doença grave, causada pelo parasitismo de órgãos do sistema fagocítico mononuclear: baço, fígado, medula óssea, linfonodos, etc. (Chappuis *et al.*, 2007). Embora, na maioria dos casos, a infecção seja assintomática ou oligossintomática (Gama *et al.*, 2004), a doença franca é caracterizada por febre, hepatoesplenomegalia, emagrecimento, anemia e um aumento de suscetibilidade a infecções (Nylén e Sacks, 2007), podendo levar à morte quando não tratada. As principais causas de óbito são infecções bacterianas oportunistas, hemorragia e anemia grave (Chappuis *et al.*, 2007).

As leishmanioses são doenças endêmicas, amplamente distribuídas, comuns nas regiões tropicais e subtropicais (Handman, 2001), podendo ser zoonoses, envolvendo animais domésticos ou selvagens como reservatórios da infecção ou antroponoses, envolvendo humanos como reservatórios (Kamhawi, 2006). As espécies animais que atuam como reservatórios primários na natureza são bem adaptadas ao parasitismo por *Leishmania* e desenvolvem a forma subclínica ou infecção branda que pode persistir durante anos. Em áreas endêmicas de leishmaniose visceral (LV) nas Américas e nos países da bacia do Mediterrâneo, o cão doméstico é o reservatório mais importante, mas este animal é altamente suscetível, apresentando normalmente doença progressiva e fatal (Dedet e Pratlong, 2009).

Estima-se 1,3 milhões de novos casos de leishmaniose por ano, com incidência anual de 20-30 mil mortes. Anualmente estima-se entre 200-400 mil e entre 0,7-1,3 milhões de novos casos de leishmaniose visceral e cutânea, respectivamente (WHO, 2014). As leishmanioses afetam 98 países (Alvar *et al.*, 2012): 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em seis países, Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil, e 95% dos casos de leishmaniose cutânea se concentram nas Américas, bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central, com dois terços dos casos concentrados nos países Afeganistão, Argélia, Irã, Síria, Brasil e Colômbia (WHO, 2014). Dados reais confiáveis de incidência e prevalência são escassos devido ao fato de que apenas 33 países fazem notificação oficial da infecção (Cattand *et al.*, 2006; Guerin *et al.*, 2002). No Brasil, essa doença é considerada um agravo de notificação compulsória (Ministério da Saúde, 2010) e há registro em todas as Unidades Federativas (Ministério da Saúde, 2007).

No Brasil, as leishmanioses são um grave problema de saúde pública, visto o aumento de sua incidência associada a altas taxas de morbidade e a difusão destas doenças para novas áreas geográficas (Brandão-Filho e Shaw, 1994). Apesar de serem classificadas como a nona doença infecciosa em termos de risco para a população mundial, são consideradas doenças negligenciadas (Alvar *et al.*, 2012; Hotez *et al.*, 2004), devido ao pouco interesse de investidores, autoridades políticas e profissionais interessados em pesquisa acerca do controle e prevenção da doença (Tuon e Amato, 2008).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Leishmania*

O gênero *Leishmania* (Figura 2.1) pertence ao taxon Kinetoplastea (Maslov *et al.*, 2013), família Trypanosomatidae e compreende protozoários parasitas transmitidos aos mamíferos por fêmeas infectadas de insetos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo) (Ready, 2011).

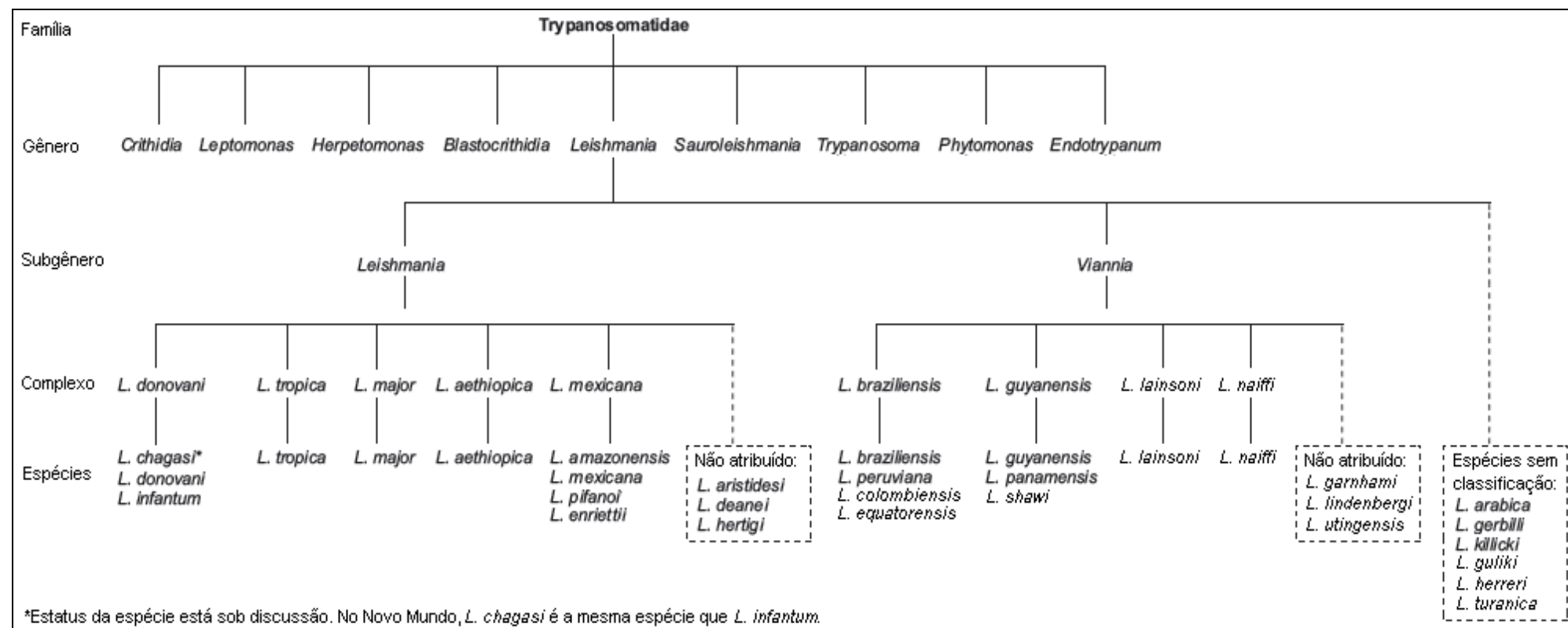
De acordo com Desjeux (2004), vinte espécies de *Leishmania* são patogênicas para os humanos, enquanto trinta espécies de insetos flebotomíneos são vetores comprovados.

Lainson e Shaw (1979) propuseram a classificação taxonômica das espécies do gênero *Leishmania* em três categorias – suprapilária, peripilária e hipopilária – baseados na distribuição anatômica diferencial das formas promastigotas metacíclicas dentro do trato digestivo do vetor. O desenvolvimento da espécie *Leishmania* suprapilária é restrito à porção do trato digestivo anterior ao piloro; o desenvolvimento da *Leishmania* peripilária é restrito ao intestino médio abdominal e à região pilórica; e o desenvolvimento da *Leishmania* hipopilária é intrínseco ao intestino posterior.

Posteriormente, considerando a colonização do trato alimentar pelas espécies de *Leishmania*, Lainson e Shaw (1987) introduziram a divisão do gênero *Leishmania* em dois subgêneros (Figura 1): *Leishmania* Saf'Janova, 1982 (= Ross, 1903) e *Viannia* (Lainson e Shaw, 1987), respectivamente, para parasitas com desenvolvimento suprapilárico e peripilárico (Pimenta, Secundino e Blanco, 2003). *L. infantum* e *L. amazonensis* pertencem ao subgênero *Leishmania* enquanto *L. braziliensis* é incluída no subgênero *Viannia* (Banūls, Hide e Tibayrenc, 1999).

A este método de diferenciação de espécies, somam-se outros métodos, tais como: emprego de anticorpos monoclonais, análise de isoenzimas, RAPD, PCR-RFLP, hibridização e sequenciamento de DNA (de Alcântara, 2006).

Figura 2.1. Taxonomia da família Trypanosomatidae, com destaque para o gênero *Leishmania*.



Fonte: Adaptado de esquema apresentado pelo WHO (2010) e de dados apresentados pelo Taxonomy Browser (2013).

2.2 Ciclo biológico de *Leishmania* sp.

Todas as espécies de *Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatórios de macrófagos. A multiplicação deste parasito em seus hospedeiros é caracterizada por divisão binária. Em seu ciclo de vida heteroxênico, estes protozoários apresentam-se sob duas formas distintas: promastigotas, alongadas, flageladas e móveis, que vivem no lúmen do tubo digestivo do inseto vetor; e amastigotas, arredondadas, sem flagelo aparente, que vivem no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (Carvalho *et al.*, 1994).

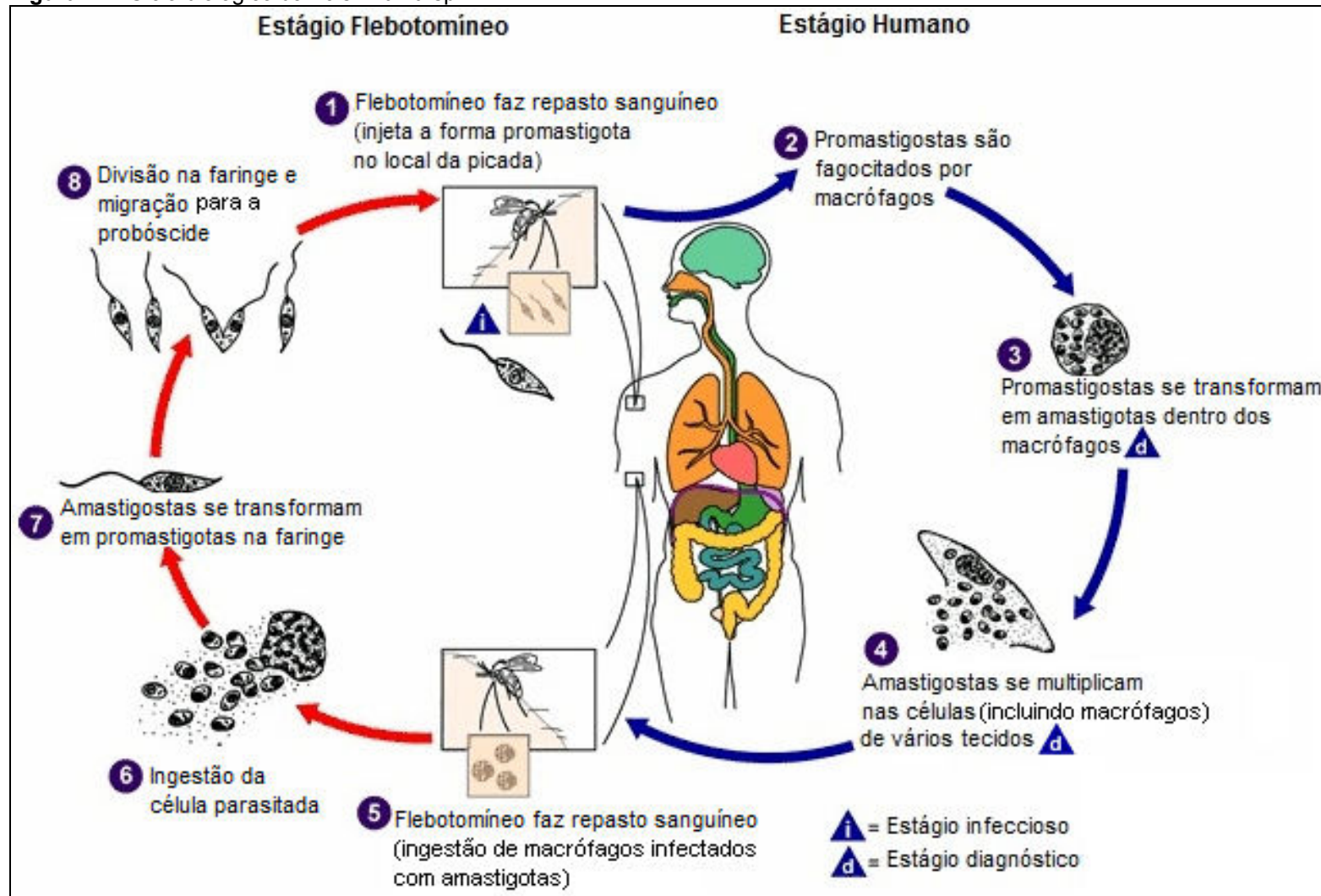
A infecção por *Leishmania* no hospedeiro vertebrado (Figura 2.2) ocorre através da inoculação das formas promastigotas metacíclicas durante o repasto do inseto vetor, as fêmeas de flebotomíneos (Bates e Rogers, 2004). Após a inoculação ocorre a adesão da forma promastigota metacíclica ao macrófago. Esta etapa é mediada por inúmeras moléculas na superfície dos macrófagos e parasitos. As principais moléculas presentes na superfície do parasito são o lipofosfoglicano (LPG), a glicoproteína gp63 (Liu e Uzonna, 2012) e o glicosilinositol fosfolipídio (GIPL) (Zhang *et al.*, 2004).

O LPG tem sua estrutura variada entre as diferentes espécies de *Leishmania* (McConville *et al.*, 1995), além de variar entre as formas promastigotas procíclicas e metacíclicas e ser quase completamente ausente nas formas amastigotas (McConville *et al.*, 1992). Nos flebotomíneos, o LPG é responsável pela adesão e liberação dos promastigotas procíclicas do intestino médio, enquanto nos hospedeiros vertebrados, o LPG confere resistência aos promastigotas metacíclicas contra a lise pelo complemento e o estresse oxidativo (Zhang *et al.*, 2004). O GIPL é a molécula de superfície mais abundante nas formas promastigotas, sendo 10 vezes mais abundante que o LPG (Olivier, Gregory e Forget, 2005). Devido a grande quantidade de GIPL na superfície das amastigotas, Zhang *et al.* (2004) sugerem que estas moléculas possuem papel fundamental na sobrevivência e virulência destas. A glicoproteína gp63 é uma protease presente na superfície do promastigota; é 10 vezes menos abundante que o LPG no promastigota, sendo sua presença mascarada pela grande quantidade de LPG. Como na forma amastigota o LPG é praticamente ausente, a expressão da glicoproteína gp63 é mais evidente, conferindo proteção aos amastigotas na ausência de LPG (McConville *et al.*, 1995).

Após a adesão, as formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos, localizando-se em uma vesícula chamada fagossomo. Posteriormente, o fagossomo se funde com o lisossomo, formando o fagolisossomo (Russell, 1995). No interior dos fagolisossomos, dentro de 12-24h, a promastigota diferencia-se em amastigota e se reproduz por divisão binária. Quando a célula hospedeira está densamente parasitada, ocorre o rompimento da membrana e a infecção de novos macrófagos (Murray *et al.*, 2005), possibilitando a infecção do inseto vetor durante o repasto sanguíneo e consequente manutenção do ciclo biológico do parasito (Lainson e Shaw, 1988).

Quando um flebotomíneo se alimenta do sangue de um hospedeiro vertebrado infectado, ele ingere macrófagos e monócitos contendo formas amastigotas que são liberadas no seu intestino médio, onde se desenvolvem em formas promastigotas procíclicas não infectivas. Estas passam pelo processo da metaciclogênese, através do qual adquirem virulência, tornando-se promastigotas metacíclicas, que são as formas infectivas para o hospedeiro mamífero (Silva e Sacks, 1987). Estas migram para a faringe e a cavidade bucal do flebotomíneo, para serem transmitidas durante o repasto sanguíneo (Assche *et al.*, 2011).

Figura 2.2. Ciclo biológico da *Leishmania* sp.



Fonte: Adaptado de CDC (2013).

2.3 Ciclos de transmissão da *Leishmania* sp.

A relação do agente etiológico com os insetos flebotomíneos e os diversos mamíferos hospedeiros reservatórios resulta na formação de diversos ciclos de transmissão (Rangel e Lainson, 2009). Os ciclos de transmissão que ocorrem no Brasil estão resumidos na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Ciclos de transmissão das leishmanioses no Brasil envolvendo diversidade de espécies de parasito, vetores e reservatórios.

<i>Leishmania</i> spp.	Vetor <i>Lutzomyia</i> comprovado* ou suspeito**	Animal reservatório comprovado* ou suspeito**
<i>L. (V.) guyanensis</i> Floch, 1954	<i>Lu. umbratilis</i> , <i>Lu. anduzei</i> , <i>Lu. Whitmani</i>	<i>Choloepus</i> spp., <i>Tamandua</i> spp., <i>Didelphis</i> spp., <i>Proechimys</i> spp.
<i>L. (L.) amazonensis</i> Lainson e Shaw, 1972	<i>Lu. flaviscutellata</i> , <i>Lu. Longipalpis</i>	<i>Proechimys</i> spp., <i>Oryzomys</i> spp., <i>Wiedomys</i> spp.
<i>L. (V.) braziliensis</i> Vianna, 1911	<i>Lu. whitmani</i> , <i>Lu. intermedia</i> , <i>Lu. wellcomei</i> , <i>Lu. complexa</i> , <i>Lu. neivai</i> , <i>Lu. edwardsi</i> , <i>Lu. migonei</i>	<i>Canis familiaris</i> , <i>Rattus rattus</i> , <i>Akodon arviculoides</i> , <i>Bolomys</i> spp., <i>Nectomis</i> spp., <i>Thrichomys</i> spp.
<i>L. (L.) infantum</i> (= <i>chagasi</i>) Nicolle, 1908	<i>Lu. longipalpis</i> , <i>Lu. cruzi</i> , <i>Lu. almerio</i> , <i>Lu. salesi</i>	<i>Canis familiaris</i> , <i>Lycalopex vetulus</i> , <i>Cedocyon thous</i> , <i>Didelphis albiventris</i> , <i>Felis catus</i>
<i>L. (V.) lainsoni</i> Silveira et al., 1987	<i>Lu. ubiquitous</i>	<i>Agouti paca</i>
<i>L. (V.) shawi</i> Lainson et al., 1989	<i>Lu. whitmani</i>	<i>Cebus apella</i> , <i>Chiropotes satanus</i> , <i>Nasua nasua</i> , <i>Bradypus tridactylus</i> , <i>Choloepus didactylus</i>
<i>L. (V.) naiffi</i> Lainson e Shaw, 1989	<i>Lu. squamiventris</i> , <i>Lu. paraensis</i> , <i>Lu. amazonensis</i> , <i>Lu. ayrozai</i>	<i>Dasypus novemcinctus</i>
<i>L. (V.) lindenbergi</i> Silveira et al., 2002	Desconhecido	Desconhecido

Fonte: Adaptado de WHO (2010); Silveira, Lainson e Corbett (2004).

Notas:

*Vetor comprovado: antropofílico e pica reservatório animal, encontrado naturalmente infectado com um parasito indistinguível daquele encontrado em seres humanos e reservatórios.

**Reservatório comprovado: abriga parasito na natureza e tem sido demonstrado manter a população de parasitos através de estudos ecológicos.

**Vetor suspeito: antroponóico com distribuição geográfica compatível com os focos endêmicos; pode ser suspeito com base em dados epidemiológicos; pode ter sido encontrado naturalmente infectado, mas sem parasito identificado; ou é suspeito, porque é um vetor comprovado em outros lugares.

**Reservatório suspeito: encontrado infectado na natureza, mas sem determinação da extensão da infecção.

2.4 Associação entre espécie e forma clínica

As características clínicas das leishmanioses tendem a variar entre e dentro das regiões endêmicas, refletindo as diferentes espécies do parasita ou o tipo de ciclo de transmissão zoonótico ou antroponóico, além da resposta imunológica e dos determinantes genéticos de cada paciente. Os mecanismos que determinam a preferência tecidual do protozoário (Tabela 2.2), dermatrópica (pele e mucosas) ou viscerotrópica (órgãos internos), ainda não estão estabelecidos, porém são considerados específicos das distintas espécies de *Leishmania* (WHO, 2010).

Tabela 2.2. Espécies de *Leishmania* encontradas em humanos e classificação de acordo com o subgênero e a preferência tecidual do protozoário (dermotrópica, mucotrópica ou viscerotrópica).

Subgênero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Velho Mundo	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> ^a <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i>		
Novo Mundo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> ^a <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> ^a <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. lindenberg</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis</i> ^b	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. guyanensis</i> ^c
Principal tropismo	Viscerotrópica	Dermotrópica	Dermotrópica	Mucotrópica

Fonte: Adaptado de WHO (2010).

Notas:

^aStatus da espécie sob discussão

^bPosição taxonômica sob discussão

^cGuerra *et al.* (2011)

No Novo Mundo, os protozoários *L. (V.) mexicana*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* são típicos parasitos dermatrópicos e somente *L. (L.) infantum* é capaz de visceralizar (Pimenta, Secundino e Blanco, 2003). No Velho

Mundo, *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica* são exemplos de espécies que causam lesões na pele, enquanto *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani* são parasitas capazes de causar leishmaniose visceral (WHO, 2010). No entanto, há relatos de isolamento de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani* de lesões cutâneas (Gramiccia, Gradoni e Pozio, 1987; Pratlong *et al.*, 1995), assim como *L. (L.) major* (Schnur *et al.*, 1985) e *L. (L.) amazonensis* (Barral *et al.*, 1991; Cardoso *et al.*, 2010) de pacientes com leishmaniose visceral.

2.5 Imunopatologia das leishmanioses

A resposta imune pode ser classificada em duas categorias: inata e adaptativa. A resposta imune inata possui mecanismos eficientes para a rápida detecção e eliminação de patógenos (Bonilla e Oettgen, 2010), englobando barreiras físicas, químicas e microbiológicas, além de outros elementos do sistema imune (neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, citocinas, quimiocinas, complemento, proteínas de fase aguda, etc.) (Parkin e Cohen, 2001). Já a resposta adaptativa é o resultado de uma evolução filogeneticamente mais recente no sentido de fornecer um repertório mais amplo e refinado de reconhecimento de antígenos próprios (*self*) e não-próprios (*nonself*) (Bonilla e Oettgen, 2010), envolvendo linfócitos T e B (Parkin e Cohen, 2001).

2.5.1 Resposta imune inata

Apesar de não ser antígeno-específico, o sistema imune inato é capaz de discriminar moléculas estranhas ao organismo. Os fagócitos possuem receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que reconhecem estruturas denominadas padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) presentes nos microorganismos (Medzhitov e Janeway, 2000). Além disso, durante as respostas induzidas por dano, muitas moléculas endógenas e espécies reativas ao oxigênio (ROS) podem estimular a resposta imune quando liberadas para o meio extracelular. Estas moléculas têm sido denominadas de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), a fim de identificar as moléculas derivadas do hospedeiro que sinalizam dano celular ou tecidual (Saïd-Sadier e Ojcius, 2012).

Os PRRs estão presentes nos macrófagos e nas células dendríticas e incluem os receptores Toll-like (TLRs) e o domínio de oligomerização do nucleotídeo (NOD

ou receptores NOD-like (NLRs)) (Aguilera, Darby e Melgar, 2014). A estimulação de TLRs e NLRs induz a formação de um complexo proteico denominado inflamassoma, que detectam sinais de perigo (Kurashima, Goto e Kiyono, 2013).

Estas vias de reconhecimento destacam a estreita relação entre a resposta inata e a adaptativa, na qual os PRRs reconhecem componentes microbianos, os PAMPs, ou componentes relacionados ao dano, os DAMPs, e, em seguida, induzem a produção de citocinas e quimiocinas, que recrutam e ativam linfócitos antígeno-específicos e inicia a resposta imune adaptativa (Medzhitov e Janeway, 2000; Saïd-Sadier e Ojcius, 2012).

Como as interações que permitem a resposta inata destruir patógenos, tais como fagocitose e lise pelo complemento, dependem da exposição da superfície do microorganismo, esta resposta se limita, em grande parte, à destruição extracelular de organismos (Parkin e Cohen, 2001).

A infecção por *Leishmania* sp. tem início com a inoculação das formas promastigotas metacíclicas na pele através da picada da fêmea do flebotomíneo (Lainson e Shaw, 1987). Alguns desses parasitos conseguem escapar da lise mediada pelo sistema complemento e entrar em contato com as células apresentadoras de antígenos, como macrófagos (Sacks e da Silva, 1987) e células dendríticas (DC) (Passero *et al.*, 2012).

2.5.1.1 Macrófagos

A resistência à lise pelo complemento e o mecanismo de interação entre o parasito e o macrófago se deve às moléculas presentes na superfície do parasito, que desempenham papéis fundamentais na sobrevivência das formas promastigota e amastigota, além da modulação da resposta imune do hospedeiro (Olivier, Gregory e Forget, 2005).

Após o reconhecimento e ativação dos macrófagos, estes fagocitam as promastigotas, que ficam retidas dentro dos fagossomos. Estes se fundem aos lisossomos, formando os fagolisossomos. Estudos recentes demonstram que muitos neutrófilos também são recrutados para o local da infecção, aonde reconhecem os parasitos e os fagocitam. Como os neutrófilos são fagócitos de vida curta, servem como “hospedeiros intermediários”, sendo usados pela *Leishmania* sp. como uma forma de entrar silenciosamente nos macrófagos, evitando a sua ativação. Uma vez que os macrófagos fagocitem os neutrófilos, se tornam os “hospedeiros definitivos”

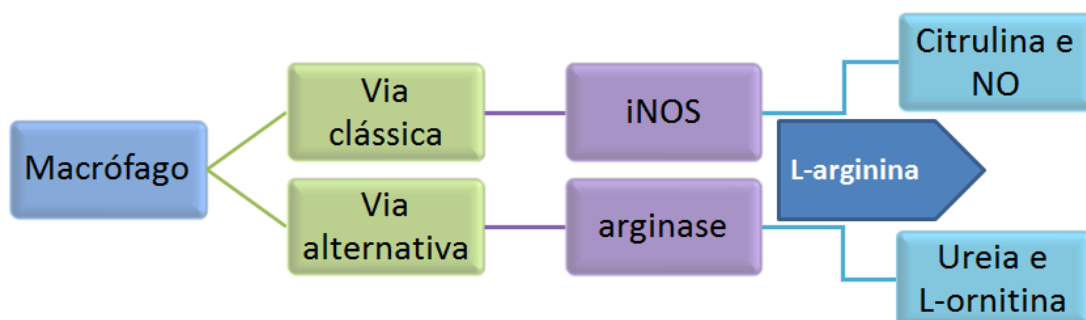
para a proliferação dos parasitos e células efetoras para a destruição dos mesmos (Peters e Sacks, 2009; Liu e Uzonna, 2012).

Após a formação dos fagolisossomos, ocorrem vários processos celulares, dentre eles: degradação das enzimas produzidas dentro dos fagolisossomos (por exemplo, proteases, nucleases, fosfatases, lipases e esterases), estresse oxidativo e produção de óxido nítrico (NO) (Assche *et al.*, 2011).

A degradação das enzimas produzidas dentro dos fagolisossomos torna o ambiente bastante ácido e hidrolítico. Além disso, no interior do fagolisossomo, também acontece o estresse oxidativo provocado pela enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) devido ao aumento do consumo de oxigênio durante o processo de fagocitose (Assche *et al.*, 2011). Como consequência, os macrófagos começam a liberar ROS, como radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), NO, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($HO\bullet$), hipoclorito ($HOCl^-$) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (Almeida *et al.*, 2012).

Os macrófagos podem ser ativados por duas vias (clássica e alternativa), resultando no metabolismo diferencial do substrato L-arginina por duas enzimas, iNOS ou arginase. Na via clássica, a iNOS catalisa a hidroxilação do L-arginina em N^{ω} -hidroxi-L-arginina (LOHA), que depois é oxidada formando citrulina e NO. Na via alternativa, a arginase promove a hidrólise do L-arginina formando ureia e L-ornitina (Iniesta, Gomez-Nieto e Corraliza, 2001).

Figura 2.3. Representação das vias de ativação de macrófagos: clássica e alternativa.



Fonte: Adaptado de Iniesta, Gomez-Nieto e Corraliza (2001).

A NO está envolvida em processos microbicidas da *Leishmania*, enquanto a L-ornitina é um substrato essencial para a produção de poliaminas, nutrientes essenciais para o crescimento e proliferação da *Leishmania*. Como as duas vias competem pelo mesmo substrato, acredita-se que a ativação de uma possa suprimir

a outra, direta ou indiretamente através dos seus produtos intermediários (Muleme *et al.*, 2009).

Além do substrato em comum, estas enzimas também são competitivamente reguladas por citocinas secretadas por células Th1 e Th2. As citocinas Th1 induzem a via clássica de ativação e as citocinas Th2 induzem a via alternativa de ativação dos macrófagos (Kropf *et al.*, 2005). De acordo com Muleme *et al.* (2009), a *Leishmania* também produz sua própria arginase, favorecendo sua infectividade e patogênese da doença.

Os promastigotas são sensíveis ao ambiente ácido e hidrolítico do fagolisossomo, de modo que esses mecanismos citotóxicos de resistência dos macrófagos favorecem a sua eliminação da célula hospedeira (Passero *et al.*, 2012). Porém, uma vez fagocitadas, as promastigotas começam a se diferenciar em amastigotas, que são mais resistentes (Olivier, Gregory e Forget, 2005). De acordo com Bogdan e Rölinghoff (1998), o LPG inibe a formação do fagolisossomo e elimina os radicais $O_2^{\cdot-}$ e HO^{\cdot} liberados após a ativação da NADPH durante a fagocitose. A inibição da biogênese do fagolisossomo mediada pelo LPG seria um mecanismo usado pelo parasito para ganhar tempo para a transformação em amastigota, que é mais resistente que a promastigota ao meio com pH ácido e rico em enzimas do fagolisossomo.

Algumas espécies de *Leishmania* também adotam outros mecanismos de defesa para lidar com o estresse oxidativo, como diminuição da produção de superóxidos e de óxido nítrico e expressão de enzimas e proteínas antioxidantes (Assche *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2012). Os amastigotas também induzem a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e fator de crescimento do tipo beta (TGF- β , do inglês *transforming growth factor beta*), que auxiliam na supressão da produção de IL-12, $O_2^{\cdot-}$ e NO (Bogdan e Rölinghoff, 1998; Kima, 2007). Proudfoot *et al.* (1996) afirmam que o LPG pode regular a expressão de iNOS e influenciar na sobrevivência do parasito.

2.5.1.2 Células dendríticas

As células dendríticas (DC) são derivadas da medula óssea e são capazes de reconhecer, fagocitar, transportar antígenos de *Leishmania* sp. para os linfonodos de drenagem, visando a apresentação desses antígenos para células T naive (Th0), que irão se diferenciar e se proliferar em células T efectoras CD4+ (Th1 e Th2), de

modo a iniciar a resposta imune primária de células T (Silveira *et al.*, 2009). As DCs possuem extensões citoplasmáticas que visam maximizar o encontro com as células T, moléculas de adesão para assegurar o íntimo contato com as células T, um eficiente sistema de processamento de antígenos e altos níveis de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) em sua superfície para apresentação de antígenos (Shortman e Caux, 1997).

As DCs abrangem um sistema que ocupa porções determinadas de órgãos linfóides e não linfóides; recebem diferentes denominações de acordo com a sua distribuição, porém com propriedades semelhantes: células de Langerhans e células dendríticas intersticiais (órgãos não linfóides); células veladas de linfáticos aferentes e células dendríticas sanguíneas (circulação) e; células dendríticas linfóides e células interdigitantes (órgãos linfóides) (Steinman, 1991).

Existem ainda os precursores destas células, que requerem um maior desenvolvimento para adquirir a forma e a função de células dendríticas por completo. Exemplos de precursores de DC são células dendríticas plasmocitóides (pDCs), monócitos (além de precursores dos macrófagos também atuam como precursores de DC) e células dendríticas inflamatórias (iDCs) (Shortman e Naik, 2007).

Segundo Shortman e Caux (1997), as células de Langerhans epidérmicas constituem um bom modelo de “história de vida” para as células dendríticas. Os autores descrevem que as células de Langerhans da pele atuam em fases distintas: primeiro, a fase de absorção, na qual a célula de Langerhans atua como sentinela no local de entrada do antígeno; segundo, a fase migratória, na qual a célula de Langerhans se move para os linfonodos com os antígenos processados; e, a terceira, fase das células dendríticas maduras, na qual ocorre a interação com células T específicas.

As células de Langerhans epidérmicas diferem funcionalmente das formas maduras das DCs em alguns aspectos. Elas não são eficazes em ativar células T, porém são capazes de realizar fagocitose e processamento de antígenos (Sousa, Stahl e Austyn, 1993). Após algum período atuando como sentinelas na pele, as células de Langerhans podem receber um sinal, orientando-as a recolher amostras de antígeno do ambiente local (Shortman e Caux, 1997; Shortman e Naik, 2007). Esse sinal pode ser o próprio antígeno ou dano tecidual, incluindo contato com sensibilizantes, bactéria ou luz UV (Cyster, 1999b), mediado pelas citocinas fator de

estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), TNF- α , IL-1 (Cumberbatch e Kimber, 1992; Roake *et al.*, 1995), IL-6 e IL-12 (Ibrahim, Chain e Katz, 1995). A célula de Langerhans deixa o tecido através da linfa aferente (como células veladas de linfáticos aferentes) e entra nos linfonodos de drenagem, onde passa a ser DC madura. Durante o trajeto até os linfonodos, as células de Langerhans são submetidas a uma série de eventos que levam à sua maturação, passando de células com pouca capacidade de geração de imunidade adaptativa para as mais potentes de todas as células apresentadoras de antígenos. Desse modo, apesar de perder parte da sua habilidade em absorver antígenos e de realizar fagocitose (Sousa, Stahl e Austyn, 1993), ocorre um aumento da sua capacidade em apresentar antígenos e estimular células T (Shortman e Caux, 1997).

De acordo com Favali *et al.* (2007), muitos patógenos têm desenvolvido mecanismos para evitar a resposta imune do hospedeiro, interferindo, por exemplo, na biologia e na função das DCs. Além disso, estudos recentes relacionados ao papel das DCs na imunopatogênese da leishmaniose experimental contestam o paradigma postulado de que as células de Langerhans atuam principalmente ativando resposta imune por células T (Ritter e Osterloh, 2007) e sugerem que as células de Langerhans podem representar um mecanismo de evasão usado pela *Leishmania* sp. para evitar resposta imune mediada por células T e induzir imunossupressão (Silveira *et al.*, 2008).

2.5.2 Resposta imune adaptativa

O paradoxo da resposta imune anti-*Leishmania* é o fato de que o macrófago é ao mesmo tempo a principal célula efetora da eliminação dos amastigotas e o principal abrigo para a proliferação e disseminação do parasito (Birnbaum e Craft, 2011).

Durante o desenvolvimento das células responsáveis pela resposta adaptativa (linfócitos B e T), conjuntos de segmentos gênicos são rearranjados para formar os receptores de antígenos específicos destas células. Este rearranjo gera um repertório incrivelmente diversificado de especificidades, potencialmente capaz de reconhecer componentes de todos os patógenos. Além desta especificidade fina, outra característica principal da resposta adaptativa é a geração de memória imunológica. No primeiro encontro com um antígeno, clones específicos de células T e B de memória são expandidos. Como têm vida longa, em um segundo encontro,

estas células de memória são mais rapidamente ativadas para produzir uma resposta protetora mais precoce e mais robusta (Bonilla e Oettgen, 2010).

De forma geral, embora a resposta imune inata não se altere com a repetição da exposição a um dado agente infeccioso, a resposta adaptativa torna-se mais eficiente a cada encontro sucessivo com o mesmo patógeno. Uma vez que a imunidade inata é ativada antes da adaptativa, seu papel principal é o de iniciar precocemente a defesa contra infecções. Além disso, cada vez se dá mais atenção ao papel imunomodulador da resposta inata na configuração da resposta adaptativa subsequente. As células envolvidas na resposta inata (tais como macrófagos e células dendríticas) não apenas ativam funções efetoras inatas como também secretam mediadores solúveis (citocinas e quimiocinas) que influenciam o tráfego celular, atraindo células efetoras e concentrando linfócitos T e B (responsáveis pela resposta adaptativa) nos sítios de infecção e apresentação antigênica. Assim, a resposta imune inata não apenas protege o organismo contra uma dada infecção enquanto ocorre o desenvolvimento mais lento dos mecanismos adaptativos, mas também direciona e molda as características qualitativas e quantitativas da resposta imune adaptativa (Stenger e Rölinghoff, 2001).

2.5.2.1 Respostas Th1 e Th2

O modelo murino de leishmaniose experimental tem demonstrado de forma clara que o ambiente de citocinas e quimiocinas determina se células T naive presentes no linfonodo de drenagem do sítio da lesão ou recrutadas da corrente sanguínea irão se desenvolver em células T helper tipo 1 (Th1) protetoras ou em células T helper tipo 2 (Th2) promotoras de doença (Solbach e Laskay, 2000). É importante ressaltar que o desenvolvimento de resposta Th1 ou Th2 em modelos murinos não reproduz fielmente o que acontece nas leishmanioses humanas, onde um quadro misto da resposta pode ser observado frequentemente (WHO, 2010).

No caso da estimulação de células Th1, as principais citocinas envolvidas são IL-2, IL-12, INF- γ e TNF- α . As atividades dessas citocinas levam ao controle da infecção. A IL-2, produzida principalmente por células T antígeno-específicas CD4+ e CD8+ (Fehniger *et al.*, 2003), promove a maturação e a proliferação dessas células (Smith, 1988), além de aumentar a produção de outras citocinas (James *et al.*, 2013). A IL-12, produzida por células apresentadoras de antígenos como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, promove a síntese de INF- γ pelas

células T e NK e a proliferação e a diferenciação de células Th1 (Biron e Gazzinelli, 1995; Bogdan *et al.*, 1996). O TNF- α , secretado por macrófagos e linfócitos, participa de uma série de mecanismos, incluindo estimulação da liberação de citocinas, ativação de macrófagos e de células polimorfonucleares e coestimulação de linfócitos B e T (Cumberbatch e Kimber, 1992). Por sua vez, o INF- γ atua na ativação de macrófagos, atividade reforçada sinergicamente pelo TNF- α . O controle da infecção por *Leishmania* sp. inclui a ativação eficiente de células NK e a ativação de macrófagos via INF- γ , seguido da produção de óxido nítrico e morte de parasitas (Alexander e Bryson, 2005).

Por outro lado, as citocinas IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β estão envolvidas com a resposta Th2, que na leishmaniose contribuem para a progressão da doença. A IL-4 promove a diferenciação de células T naive em células efetoras “Th2-like” secretoras de IL-4 e IL-5, além de diminuir a produção de IFN- γ (Swain *et al.*, 1990; Noben-Trauth, 2000). A IL-10 impede o processo de apresentação de antígenos e inibe a síntese das citocinas IL-2, IFN- γ (Seder *et al.*, 1992), IL-12 (Koch *et al.*, 1996), IFN- α , IL-1, IL-6 e TNF- α (Park e Cohen, 2001). A IL-13 atua sobre a proliferação de células B (McKenzie *et al.*, 1993) e possui ação imunossupressora sobre os macrófagos, diminuindo a liberação das citocinas IL-12 (Skeen *et al.*, 1996; Haber *et al.*, 2009), IL-1 β , IL-8 e da quimiocina MCP-1 (Seitz *et al.*, 1996). Yamakami *et al.* (2002) demonstraram que as citocinas IL-4 e IL-10, juntas, são capazes de inibir o desenvolvimento de células Th1 e de induzir resposta Th2 no início da infecção, assim como manter essa resposta após esse período inicial. Além disso, Noben-Trauth (2000) afirma que as citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 interferem no processo de ativação de macrófagos via IFN- γ e, portanto, inibem a eliminação dos parasitas.

O TGF- β também atua na supressão da atividade leishmanicida de macrófagos das seguintes formas: possui a capacidade de diminuir a imunidade mediada por células, suprimindo a ação do IFN- γ de induzir a expressão de antígenos MHC de classe II em células apresentadoras de antígenos (Barral *et al.*, 1995; Gollnick *et al.*, 1995); e é capaz modular a atividade e diferenciação das subpopulações de células T CD4+ e CD8+ (Letterio e Roberts, 1998). Barral *et al.* (1995) demonstraram, em pacientes com LC e LM, que o TGF- β possui efeito inibitório sobre células T citotóxicas CD8+, que possuem papel importante na eliminação de células infectadas.

2.5.2.2 Outras subpopulações de células T CD4⁺

O processo de diferenciação de células T já foi considerado um “processo binário”, com células Th1 secretando IFN- γ e células Th2 secretando IL-4, IL-5 e IL-13. Por cerca de vinte anos, o paradigma Th1/Th2 foi usado para explicar vários aspectos de imunidade e inflamação. Entretanto, em meados dos anos 2000, após a descoberta da linhagem Th17, outras subpopulações de células T, como células T regulatórias (Tregs), células T helper foliculares (Tfh), células Th22 e Th9, já foram descritas participando dos processos imunes e inflamatórios (Sundrud e Trivigno, 2013). Neste tópico serão descritas apenas as subpopulações Th17 e Tregs, cujo papel na imunologia das leishmanioses tem sido investigado.

Células Th17 são uma subpopulação de células T CD4⁺ que produzem IL-17, desempenhando importante papel na morte de patógenos durante as reações de defesa do hospedeiro e na indução de resposta inflamatória tecidual em doenças auto-imunes (Shen *et al.*, 2014).

De acordo com Bedoya *et al.* (2013), essa subpopulação envolve uma série de fatores de transcrição, citocinas e funções imunológicas que as diferem das células Th1 e Th2. Resumidamente, a indução dessas células ocorre através da combinação de IL-6 com TGF- β , IL-21 ou TGF- β (na ausência de IL-6), indução que pode ser reforçada pelas citocinas IL-23, IL-1 β , TNF- α e altos níveis de sódio. A linhagem Th17 produz algumas citocinas como IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-21, GM-CSF, TNF- α , IL-9, IL-10 e IFN- γ e pode ser regulada negativamente pelas citocinas IL-25, IL-27, IL-2, pelos supressores de sinalização de citocina SOCS1 e SOCS3, e pelas vitaminas A e D.

Dois fenótipos de Th17 têm sido descritos em humanos: células CCR6⁺CCR4⁺, que produzem IL-17A sem produção de IFN- γ ; e células CCR6⁺CXCR3⁺, que produzem IL-17A com ou sem produção de IFN- γ (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Sundrud e Trivigno, 2013).

Além dos mecanismos de defesa contra infecções causadas por fungos e bactérias e da indução de algumas citocinas inflamatórias, as células Th17 também são responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos, importantes para resposta inata. Estudos também implicam em sua participação em algumas doenças autoimunes, incluindo esclerose múltipla, psoríase, artrite reumatoide, asma, lúpus eritematoso sistêmico e doença inflamatória do intestino (Bedoya *et al.*, 2013).

Células T regulatórias CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Tregs) são uma subpopulação de células T que atua como um dos principais fatores de regulação na tolerância imunológica e homeostase do sistema imune (Shen *et al.*, 2014), podendo reconhecer uma ampla gama de antígenos “self” e “nonself” (Sakaguchi, 2011). São originadas no timo e se deslocam para a circulação periférica, onde desenvolvem suas atividades (Wang e Zheng, 2013).

As características fenotípicas das Tregs se devem à sua constituição: expressão da proteína transmembrana CD25, componente de alta afinidade do receptor de IL-2, portanto essencial para o crescimento e sobrevivência das Tregs; expressão do receptor co-inibitório antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA4) no citoplasma e na superfície celular, relacionado a função de supressão de moléculas CD80 e CD86 nas células apresentadoras de antígenos; expressão do fator de transcrição nuclear “forkhead box” P3 (FOXP3) (Sakaguchi *et al.*, 2013), tendo sido demonstrado diversos mecanismos de supressão mediados por FOXP3, como inibição da ativação e proliferação de células T, além da morte ou inativação de células T ou células apresentadoras de antígenos (Shevach, 2009; Sakaguchi, 2011). O FOXP3 é considerado um marcador específico para diferenciar Tregs de outras subpopulações, já que o CD25 e o CTLA4 também estão presentes em outros tipos de células T (Wang e Zheng, 2013).

A atividade supressora é uma das principais características fenotípicas das Tregs, que podem suprimir respostas imunes mediadas por diferentes tipos celulares, como macrófagos, células T CD4⁺ e células T CD8⁺ (Larkin III *et al.*, 2013). Importante dizer que estas células só conseguem exercer atividade de supressão após forte estímulo antigênico. Dessa forma, após o receptor de célula T (TCR) receber um estímulo, células Treg naive aumentam a expressão do FOXP3, se proliferando e diferenciando em células Treg efetoras, que são altamente proliferativas e terminalmente diferenciadas. Grande parte dessas células Treg efetoras morrem por apoptose após grande atividade supressora (Sakaguchi *et al.*, 2013).

Recentemente, elevados níveis de IL-17 foram encontrados em pacientes com leishmaniose cutânea (Gonzalez-Lombana *et al.*, 2013) e visceral, sendo associado ao papel de proteção na leishmaniose visceral e associado com infiltração e exacerbação da doença na leishmaniose cutânea. Em relação às Tregs, um

modelo experimental de infecção murina com *L. major*, sugere que as Tregs auxiliam na sobrevivência do parasito e na reativação da doença (Katara *et al.*, 2013).

2.5.3 Citocinas e quimiocinas

As quimiocinas fazem parte do grupo das citocinas e desempenham função importante nas respostas inflamatória e imunológica influenciando na migração de leucócitos devido às suas propriedades quimiotáticas (Parkin e Cohen, 2001). Elas são denominadas de acordo com a posição dos resíduos de cisteína na região amino-terminal como C, CC, CXC e CX₃C. Os dois principais subgrupos são CXC (α -quimiocinas) e CC (β -quimiocinas). No grupo das α -quimiocinas, duas cisteínas são separadas por um aminoácido, enquanto no grupo das β -quimiocinas, duas cisteínas são adjacentes (Baggiolini, 1998).

O sistema de quimiocinas é bastante versátil, visto que os receptores podem reconhecer mais de uma quimiocina e muitas quimiocinas se ligam a mais de um receptor (Schall e Proudfoot, 2011). Cinco receptores têm sido caracterizados para citocinas CXC e oito receptores para citocinas CC, porém, receptores de quimiocinas CXC e CC (CXCRs e CCRs) só reconhecem quimiocinas da subfamília correspondente (Baggiolini, 1998).

De modo geral, as quimiocinas são mediadores liberados nos locais de inflamação, onde tem a função de recrutar granulócitos, monócitos, células dendríticas imaturas e ativar células T, além de ativar moléculas para explosão respiratória e induzir a liberação de mediadores inflamatórios. Elas auxiliam a atrair células efetoras aos locais de inflamação para que o organismo possa responder ao patógeno ou ao dano tecidual (Cyster, 1999a). Yoshie, Imai e Nomiya (1997) afirmam que as quimiocinas também são expressas no interior dos órgãos linfóides, sendo capazes de atrair linfócitos e células NK. Além disso, o trânsito das células dendríticas em amadurecimento do local de infecção até os linfonodos de drenagem é um momento crítico para o rápido início da resposta imune adaptativa; alguns estudos indicam que as quimiocinas e os receptores de quimiocinas têm papel fundamental na migração dessas células (Cyster, 1999b).

As citocinas (Tabela 2.3) e quimiocinas são importantes mediadores das respostas imune inata e adaptativa, constituindo uma complexa rede de resposta imune (Su *et al.*, 2012). De acordo com Sacks e Noben-Trauth (2002), nas leishmanioses, de modo geral, o perfil de resistência à infecção está relacionado à

produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IFN- γ e TNF- α , enquanto o perfil de suscetibilidade se relaciona à indução de citocinas regulatórias, como IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β . Segundo Santiago *et al.* (2004), a *Leishmania* sp. induz a expressão de várias quimiocinas. Os autores citados, afirmam que a *L. major*, por exemplo, induz as quimiocinas CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES), CXCL2 (MIP-2 α) e CXCL10 (γ IP-10), além dos receptores CCR5, CCR2 e CCR1.

Tabela 2.3. Descrição das principais citocinas de acordo com a sua fonte e modo de ação.

Citocina	Fonte	Modo de ação
Interleucina-1 (IL-1)	Macrófagos	Ativação imune; induz resposta inflamatória
Interleucina-3 (IL-3)	Células T	Promove principalmente a maturação de células hematopoiéticas
Interleucina-4 (IL-4)	Células T helper	Fator de crescimento de linfócito; envolvido em resposta IgE
Interleucina-5 (IL-5)	Células T helper	Promove crescimento de células B e eosinófilos
Interleucina-6 (IL-6)	Fibroblastos	Promove crescimento de células B e produção de anticorpos; induz resposta de fase aguda
Interleucina-7 (IL-7)	Células do estroma	Fator de crescimento de linfócito; importante no desenvolvimento de células imaturas
Interleucina-8 (IL-8)	Principalmente macrófagos	Quimioatrativo
Interleucina-10 (IL-10)	Células CD4, monócitos ativados	Inibe a produção de IFN- α , IL-1, IL-6, TNF- α , e impede apresentação de antígeno
Interleucina-12 (IL-12)	Monócitos, macrófagos	Aumenta resposta T helper 1 e induz IFN- γ
Interleucina-13 (IL-13)	Células T ativadas	Estimula células B
Interleucina-15 (IL-15)*	Células T, células natural killer, monócitos, macrófagos, células dendríticas, células B	Induz proliferação de células T, células natural killer e células B ativadas; quimiotática para célula T; estimula o crescimento do epitélio intestinal
Interleucina-18 (IL-18)*	Macrófagos, células dendríticas	Induz produção de IFN- γ por pela célula T; estimula citotoxicidade da célula NK
Fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF)	Principalmente monócitos	Promove crescimento de células mielóides
Fator estimulador de colônias de monócitos (M-CSF)	Principalmente monócitos	Promove crescimento de macrófagos
Fator estimulador de colônias de granulócitos - macrófagos (GM-CSF)	Principalmente células T	Promove crescimento de células monomielocíticas
Interferon alfa (IFN- α)	Leucócitos	Ativação e modulação imune
Interferon beta (IFN- β)	Fibroblastos	Ativação e modulação imune
Interferon gama (IFN- γ)	Células T, células natural killer	Ativação e modulação imune
Fator alfa de necrose tumoral (TNF- α)	Macrófagos	Estimula ativação imune assim como fator de necrose tumoral. Conhecida como catequina
Fator beta de necrose tumoral (TNF- β)	Células T	Estimula ativação imune e efeitos vasculares. Conhecida como linfotóxina
Fator beta transformador de crescimento (TGF- β)	Plaquetas	Imunoinibitório, mas estimula crescimento do tecido conectivo e formação de colágeno

Fonte: Adaptado de Kumar e Clark (1998) apud Parkin e Cohen (2001). *Roitt e Delves (2004).

2.6 Leishmaniose tegumentar americana (LTA)

A LTA é uma doença parasitária com ampla distribuição nos países da América Latina. No Brasil são reconhecidas sete espécies causadoras da doença: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lindenbergi*, dentre as quais, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* são as principais espécies do ponto de vista da saúde pública (Silveira *et al.*, 2004).

Como dito anteriormente, dependendo da espécie de *Leishmania* e da resposta imune do indivíduo infectado, pode-se desenvolver um espectro de formas clínicas, representando diferentes padrões imunopatológicos (Lainson e Shaw, 1998; Carvalho *et al.*, 2012).

No centro do espectro clínico e imunopatológico, encontra-se a leishmaniose cutânea (LC), a forma mais frequente de LTA, que pode ser localizada ou disseminada, com uma ou mais lesões ulceradas na pele. Apresenta resposta imune celular bem modulada e responde bem ao tratamento. Seu agente etiológico pode ser qualquer espécie dos subgêneros *Viannia* ou *Leishmania*. No entanto, segundo Silveira *et al.* (2004) a LC causada pela *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* apresenta características distintas. A infecção humana com *L. (L.) amazonensis* produz lesões com bordas bastante infiltradas, caracterizando-se histopatologicamente, por um denso infiltrado dérmico de macrófagos vacuolados contendo inúmeros amastigotas, enquanto as lesões cutâneas causadas pelas espécies do subgênero *Viannia* apresentam bordas com infiltrado modesto, que se caracterizam histopatologicamente, por um infiltrado dérmico contendo frequentes linfócitos e plasmócitos, além da escassez de macrófagos e parasitas (Silveira *et al.*, 2004; Ministério da Saúde, 2007). Nas infecções causadas por *L. (V.) braziliensis* ocorre alta produção de IFN- γ , resultando na ativação de macrófagos e eliminação dos parasitas (Silveira, Lainson e Corbett, 2004). Nas infecções ocasionadas por *L. (L.) amazonensis*, segundo Silveira, Lainson e Corbett (2004), além da produção de IFN- γ , também ocorre baixa produção de IL-4, porém suficiente para diminuir a resposta Th1 nesses pacientes.

Alguns indivíduos não conseguem montar mecanismos de resposta imune eficazes e, nestes, a LC pode desenvolver uma das duas formas polares da doença: leishmaniose cutânea difusa (LCD), o pólo anérgico-multiparasitário; ou

leishmaniose mucosa (LM), o pólo hiperérgico-pauciparasitário (Ministério da Saúde, 2007; Carvalho *et al.*, 2012).

A LCD é caracterizada por ausência de resposta imune celular específica (anergia), proliferação de parasitos e disseminação das lesões nodulares ricas em amastigotas. No Brasil, é causada pela espécie *L. (L.) amazonensis* (Silveira *et al.*, 1998; Ministério da Saúde, 2007). Clinicamente, é caracterizada por infiltração difusa na pele na forma de nódulos, pápulas, tubérculos e placas, que raramente se tornam lesões ulceradas (Silveira, Lainson e Corbett, 2004). Nessa forma da doença, observam-se baixos níveis de populações de células T CD4+ e CD8+ (CD8+ > CD4+), assim como de IFN- γ . Estudos também mostram alta produção de IL-4 e IL-10 (Bonfim *et al.*, 1996), caracterizando resposta imune Th2 predominante, o que justifica a má resposta ao tratamento terapêutico (Silveira *et al.*, 2009).

Por sua vez, na LM, se observa uma resposta imune celular exacerbada e escassez de parasitos. No Brasil, é causada principalmente pela espécie *L. (V.) braziliensis* (Silveira *et al.*, 1998; Ministério da Saúde, 2007). Clinicamente é caracterizada por necrose do tecido mucoso das cavidades oral e nasofaríngea e imunologicamente pode ser caracterizada por hipersensibilidade aos antígenos de *Leishmania* e proliferação de linfócitos, além da predominância de populações de células T CD4+ sob populações de células T CD8+ (Silveira *et al.*, 2009). Também se observa o aumento da produção de IFN- γ e TNF- α (Silveira, Lainson e Corbett, 2004), e a diminuição da produção de IL-10 e TGF- β nas lesões do tecido mucoso. Estas características sugerem a predominância da resposta imune Th1 (Bacellar *et al.*, 2002). É importante citar que estes pacientes também apresentam uma expressão diminuída de receptores de IL-10, o que se reflete em uma incapacidade de modular adequadamente a resposta pró-inflamatória (Faria *et al.*, 2005).

Estes padrões imunopatológicos desenvolvidos pelas espécies dos subgêneros *Leishmania*, como, por exemplo, *L. (L.) amazonensis*, e *Viannia*, como, por exemplo, *L. (V.) braziliensis*, parecem refletir diferentes estratégias adotadas pelos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* para manter a infecção no hospedeiro mamífero. *L. (L.) amazonensis* tem grande capacidade de inibir a resposta pró-inflamatória anti-*Leishmania*, produz lesões com presença abundante de amastigotas e, como forma clínica grave, a LCD (anérgica e multiparasitária). Por outro lado, a infecção por *L. (V.) braziliensis* em indivíduos imunocompetentes geralmente cursa na presença de uma resposta imune anti-*Leishmania* do tipo 1

(pró-inflamatória, produz lesões nas quais as formas amastigotas são raras e, como forma clínica grave, a ML (hiperérgica, pauciparasitária).

2.7 Modelo murino de leishmaniose cutânea

O modelo de leishmaniose experimental em linhagens isogênicas de camundongos, com diferentes graus de suscetibilidade/resistência à *Leishmania* tem sido extensamente utilizado para a identificação de mecanismos imunológicos que determinam a resolução ou o agravamento da infecção, em especial aqueles envolvendo citocinas e subpopulações de linfócitos T (Gumy, Louis e Launois, 2004). Não obstante, a tradução dos dados obtidos no modelo murino para a compreensão da imunopatologia das leishmanioses humanas permanece um grande desafio (Kedzierski, Zhu e Handman, 2006).

A susceptibilidade ou resistência à infecção nas diferentes linhagens de camundongos se relacionam aos fatores genéticos. Ademais, diferentes variáveis podem ser introduzidas no modelo de infecção murina: dose de parasitas no inóculo (número elevado ou pequeno de parasitas), fase de desenvolvimento do agente etiológico (geralmente promastigotas em fase estacionária, podendo ser população purificada ou heterogênea), via de inoculação (intravenosa, intradérmica ou intranasal) ou ainda a infecção através do vetor flebotomíneo (Sacks e Noben-Trauth, 2002).

O modelo murino mais bem estudado é o de *L. major*, tendo sido o primeiro a ser utilizado para descrever o papel das respostas Th1 e Th2 no desenvolvimento da leishmaniose. Camundongos da linhagem BALB/c, DBA/2 e SWR/J (Felizardo *et al.*, 2012) são bastante susceptíveis, desenvolvendo lesões progressivas e doença sistêmica, enquanto camundongos das linhagens C3H/HeJ, CBA/J, C57BL/6 e 129Sv/Ev são mais resistentes, desenvolvendo pequenas lesões que dentro de algumas semanas evoluem para cura espontânea, além de serem resistentes a reinfeção (de Oliveira *et al.*, 2004). Também é possível observar uma variação da velocidade de disseminação da infecção de *L. major* a partir do local de inoculação até os linfonodos de drenagem e órgãos viscerais. A disseminação ocorre rapidamente em camundongos BALB/c, entre 10-24h, enquanto leva muito mais tempo para se disseminar nas linhagens C57BL/6, CBA/J e C3H/HeJ, cerca de três dias (Laskay *et al.*, 1995).

Na infecção de camundongos BALB/c com *L. major*, ocorre uma produção precoce de IL-4 que torna suas células T CD4⁺ incapazes de responder a IL-12, direcionando sua diferenciação para o perfil Th2 (Launois *et al.*, 1997). A citocina IL-4 também atua inibindo a secreção de IFN- γ (Wurtz, Bajénoff e Guerder, 2004), o que acaba por impedir a destruição efetiva dos parasitas e contribui conseqüentemente para a supressão da resposta tipo 1. As citocinas IL-10, IL-13 e TGF- β também participam desse processo (Sacks e Noben-Trauth, 2002). Em camundongos resistentes, a infecção é direcionada por mecanismos dependentes de IL-12, que possibilitam a ativação/expansão de células T CD4⁺ Th1 reativas a *L. major*. Estas células produzem IFN- γ , contribuindo para ativação de macrófagos e conseqüente controle da infecção (Courret *et al.* 2003).

Segundo Souza *et al.* (2000) há uma escassez de estudos acerca de modelos murinos com as espécies causadoras de leishmaniose no Novo Mundo. De modo geral, a maioria das linhagens de camundongos aparenta ser resistente a *L. (V.) braziliensis* ao passo que a maior parte das linhagens se mostra suscetível às espécies do complexo mexicana, como a *L. (L.) amazonensis* (Afonso e Scott, 1993; Souza *et al.*, 2000).

Nas infecções experimentais com *L. (L.) amazonensis*, a maioria das linhagens desenvolve lesões progressivas no local de inoculação. As linhagens BALB/c e C57BL/10 desenvolvem lesões crônicas, ao passo que as linhagens C3H, C57BL/6, DBA e CBA também desenvolvem lesões progressivas quando infectadas por *L. (L.) amazonensis*, porém bem menores do que as observadas em BALB/c e C57BL/10 (Afonso e Scott, 1993; Alves *et al.*, 2004; Felizardo *et al.*, 2012).

No modelo de infecção de BALB/c por *L. (L.) amazonensis* ocorre produção de altos níveis de IL-4, assim como disseminação do parasito (Souza *et al.*, 2000), porém os fatores que ocasionam os diferentes fenótipos de resistência e suscetibilidade das diferentes linhagens de camundongos ainda não foram bem estabelecidos para a espécie *L. (L.) amazonensis*. A resistência se relaciona a resposta do tipo 1 predominante, porém a suscetibilidade varia, podendo ser resultante da ausência da resposta do tipo 1, de uma resposta tipo 2 predominante ou até mesmo uma resposta mista tipo 1 e tipo 2 (revisado por Pereira e Alves, 2008).

Em relação a *L. (V.) braziliensis*, há poucos trabalhos em modelo murino, provavelmente devido às dificuldades do seu cultivo *in vitro* e de produção de lesões

perceptíveis através da infecção *in vivo* (de Oliveira *et al.*, 2004). Como dito anteriormente, a maioria das linhagens é resistente a *L. (V.) braziliensis*, o que tem sido associado ao fato dessa espécie não conseguir inibir a resposta imune tipo 1 desenvolvida pelo hospedeiro (de Moura *et al.* 2005).

De Moura *et al.* (2005) desenvolveram um modelo de infecção experimental intradérmica na orelha de BALB/c com *L. (V.) braziliensis* e observaram algumas características clínicas – ulceração da lesão, persistência do parasita, resposta imunológica – semelhantes às dos humanos. Nesse modelo, os camundongos desenvolvem lesões temporárias que evoluem para cura espontânea devido à resposta tipo 1 característica da infecção com esta espécie de *Leishmania*.

DeKrey, Lima e Titus (1998) conseguiram infectar camundongos BALB/c no coxim plantar usando uma alta dose de inóculo (10^7 promastigotas de *L. (V.) braziliensis*) produzindo lesões pequenas transitórias e autorresolutivas. Neste modelo, a infecção se caracterizou por altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-4 e IL-10. Utilizando o mesmo modelo, Teixeira *et al.* (2005) observaram a indução da expressão de algumas quimiocinas como CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e KC, enquanto de Moura *et al.* (2005) constataram que outras quimiocinas como a CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β e CCL5/RANTES são expressas nos linfonodos de drenagem, contribuindo para o desenvolvimento de resposta imune do tipo 1 no hospedeiro, porém havendo persistência do parasita nesses linfonodos.

3. JUSTIFICATIVA

Está se tornando evidente, através de estudos observacionais em humanos e experimentais no modelo murino, que as diferentes espécies do gênero *Leishmania* diferem nas características de sua interação com o sistema imune do hospedeiro mamífero. As complexidades e particularidades destas interações, que têm importância para o desenvolvimento de vacinas e novas terapias, estão apenas começando a ser consideradas (Colmenares *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2009).

L. (V.) braziliensis e *L. (L.) amazonensis* são ambas causadoras da leishmaniose tegumentar americana (LTA) (Camara *et al.*, 2011). No entanto, estas duas espécies mostram características imunopatogênicas contrastantes, no que se refere à sua interação com a resposta imune humana mediada por células T. Enquanto *L. (V.) braziliensis* mostra uma clara tendência a levar a infecção para o pólo hiperérgico do espectro imunopatológico, representado pela leishmaniose mucosa e caracterizado por uma resposta proeminente do tipo 1, pró-inflamatória, *L. amazonensis* mostra uma tendência oposta, conduzindo a infecção para o pólo anérgico, representado pela leishmaniose cutânea difusa e uma resposta imune marcante do tipo 2 ou reguladora (Silveira *et al.*, 2009).

L. (L.) amazonensis pertence ao subgênero *Leishmania* enquanto *L. (V.) braziliensis* é incluída no subgênero *Viannia* (Banúls, Hide e Tibayrenc, 1999). Análises das relações filogenéticas entre as espécies de *Leishmania* baseadas na comparação de sequências de DNA e eletroforese de isoenzimas indicam que estes subgêneros divergiram há 80-90 milhões de anos, no mínimo (Croan, Morrison e Ellis, 1997; Fernandes, Nelson e Beverley, 1993). Não é, portanto, surpreendente que estas duas espécies apresentem características imunopatogênicas contrastantes, no que se refere à sua interação com a resposta imune humana mediada por células T.

Como referido anteriormente na introdução, o macrófago é ao mesmo tempo a principal célula efetora da eliminação dos amastigotas e também seu refúgio contra os elementos potencialmente parasiticidas do meio extracelular, tais como anticorpos e complemento (Moreno *et al.*, 2010). A resolução da infecção é dependente da apresentação de antígenos parasitários por células dendríticas e macrófagos a linfócitos T CD4⁺ Th1. Uma vez ativadas, estas células secretam citocinas, dentre as quais se destaca o IFN- γ (Squires *et al.*, 1989), que vão ativar os

macrófagos parasitados (Birnbaum & Craft, 2011), estimulando-os a produzir moléculas leishmanicidas, como as espécies reativas de nitrogênio, derivadas da ação da óxido nítrico sintase induzível, e de oxigênio, derivadas da chamada explosão respiratória (Murray e Nathan, 1999), tornando-as capazes de eliminar a infecção.

Dados recentes têm indicado uma participação decisiva dos macrófagos na resistência e também na patologia associada à infecção por *L.(V.) braziliensis* em seres humanos, reforçando a importância da imunidade inata na proteção contra esta espécie de *Leishmania* (Giudice *et al.*, 2012).

Diante desse contexto, considerando o amplo espectro clínico da LTA e que os mecanismos pelos quais diferentes espécies de *Leishmania* causam diferentes patologias ainda são amplamente desconhecidos, pretende-se caracterizar diferenças no perfil de citocinas e quimiocinas produzidas por macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, procurando encontrar possíveis padrões nestes perfis que possam explicar as diferentes características imunopatológicas das infecções causadas por estas duas espécies de *Leishmania*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Caracterizar diversas cepas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* quanto ao cultivo *in vitro* e quanto à infectividade/virulência *in vitro* e *in vivo*.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a infectividade/virulência das cepas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* na infecção experimental de hamster;
- Comparar o perfil de cultivo axênico *in vitro* das promastigotas de *L.(V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*;
- Comparar as diferentes cepas em estudo quanto às suas características de infectividade/virulência para macrófagos murinos tais como carga parasitária intracelular, taxa de infecção de macrófagos, produção de NO e atividade de arginase;
- Caracterizar o perfil de citocinas e quimiocinas produzido por macrófagos murinos infectados com diversas cepas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos com 4 a 8 semanas de vida da linhagem BALB/c, obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL/Fiocruz). Todos os protocolos utilizados neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz (CEUA/Fiocruz) – licenças L-029/09 e LW-41/13.

5.2 Parasitos

Neste estudo foram utilizadas quatro cepas de *L. (V.) braziliensis* (MCAN/BR/1998/R619, MHOM/BR/2000/LTCP13396, MHOM/BR/2002/NMT-RBO005 e MHOM/BR/2011/RSG) e quatro cepas de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1977/LTB0016, IFLA/BR/1967/PH8, MHOM/BR/2011/S55 e MHOM/BR/2003/NJS) isoladas no Brasil. A cepa MCAN/BR/1998/R619 foi gentilmente cedida pela Dra. Maria de Fátima Madeira do Departamento de Micro-Imuno-Parasitologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz; as cepas MHOM/BR/1977/LTB0016 e IFLA/BR/1967/PH8 já vinham sendo cultivadas há alguns anos no nosso laboratório, enquanto as demais cepas foram cedidas pela Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC). A caracterização da cepa MCAN/BR/1998/R619 foi feita por isoenzimas conforme descrito em Madeira *et al.* (2003). A caracterização das demais cepas foi realizada pela CLIOC, também utilizando a metodologia de isoenzimas. O certificado de autenticação de cada cepa, expedido pela CLIOC, encontra-se no Anexo A.

Todas as cepas foram utilizadas no estudo após passagem em hamster (*Mesocricetus auratus*).

5.3 Infecção e isolamento de *Leishmania* sp. de lesão de coxim plantar de hamster

Para a infecção de hamster com as cepas em estudo, uma suspensão de formas promastigotas em solução tamponada com fosfatos (PBS, Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, EUA) foi inoculada (concentração de $3,4 \times 10^7$ /mL) por via subcutânea no coxim plantar das patas posteriores de dois hamsters (adultas fêmeas). Ao longo da infecção, os animais foram alojados em gaiolas com 2 animais com comida e água *ad libitum*. Os animais foram observados semanalmente e eutanasiados por indução em câmara de CO₂ para retirada das lesões e isolamento das formas promastigotas. Nos casos em que não houve desenvolvimento de lesões cutâneas, as cepas foram isoladas dos linfonodos poplíteos.

As lesões/linfonodos poplíteos foram retirados assepticamente. O tecido foi colocado em uma placa de Petri contendo malha de aço estéril e meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich[®]). O tecido foi macerado utilizando o êmbolo de uma seringa estéril. O homogeneizado foi transferido para um tubo de centrifuga e centrifugado a 1000 g por 5 minutos/4°C. O sedimento contendo eritrócitos e outras células foi descartado e o sobrenadante foi centrifugado a 2000 g por 5 minutos/4°C para obtenção de pellet contendo amastigotas. Em uma garrafa de cultura, o pellet foi ressuspenso em meio Schneider. Para *L. (V.) braziliensis* adicionou-se 20% de soro fetal bovino (SFB, Gibco[®], Gran Island, NY, EUA) e 2% de urina humana estéril. Para *L. (L.) amazonensis* adicionou-se 10% de soro fetal bovino. As amostras foram mantidas em estufa a 26°C.

5.4 Curvas de crescimento

O cultivo de *Leishmania* sp. foi realizado em frascos de cultura de 25 cm² contendo 5 mL de meio Schneider, para *L. (V.) braziliensis*, 20% de SFB e 2% de urina humana estéril, enquanto que para *L. (L.) amazonensis* 10% de SFB, ajustando-se a concentração inicial para 10^5 parasitos/mL. As células foram contadas uma vez por dia (preferencialmente no mesmo horário) durante 5-7 dias. Este procedimento foi realizado com todas as cepas em estudo. As amostras foram cultivadas em estufa BOD a 26°C.

5.5 Isolamento e infecção de macrófagos peritoneais de camundongos

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram obtidos a partir do lavado peritoneal com 5 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich[®]), suplementado com 200 UI/mL de penicilina (Sigma-Aldrich[®]), 200 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich[®]), 1 mM de piruvato de sódio (Gibco[®], Gran Island, NY, EUA), 1 mM de L-glutamina (SFB, Gibco[®]) e 1 M de tampão HEPES (Sigma-Aldrich[®]), mantido em banho de gelo. O lavado peritoneal dos animais foi centrifugado a 1800 g por 7 minutos/4°C, em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensão em meio RPMI 1640, sem soro fetal bovino.

As células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando como corante vital o azul de tripan a 0,1% (Sigma-Aldrich[®]) em solução tamponada com fosfatos, sendo ajustadas para uma concentração de $1-4 \times 10^6$ /mL.

Para determinação da carga parasitária intracelular, taxa de infecção de macrófagos e dosagem de NO, o cultivo das células foi feito em placas de cultura LAB-TEK[®] II (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, EUA). Foi adicionado à placa, meio RPMI 1640 com 20% de SFB (100 µL no poço) + 100 µL de células, ficando, portanto a cultura com concentração final de 10% de SFB. As placas foram colocadas em estufa a 37°C, atmosfera de 5% de CO₂, overnight. Após esse período, as placas de cultura foram lavadas com PBS a 37°C para retirar as células não aderentes.

Estes macrófagos recém isolados foram infectados com promastigotas de fase estacionária na concentração adequada (proporção de 5:1), a 37°C, atmosfera de 5% de CO₂. Após quatro horas, a placa foi lavada para retirar os parasitos não interiorizados e incubada com RPMI 1640 contendo 10% de SFB.

Para posterior quantificação da infecção por microscopia ótica, as lâminas dos tempos de infecção de 24, 48 e 72 horas foram lavadas em PBS a 37°C, fixadas e coradas.

Para dosagem de NO, coletou-se o sobrenadante após incubação em 24, 48 e 72 horas. Para evitar interferências e artefatos de técnica, centrifugou-se o sobrenadante a 2000 g por 7 minutos/4°C. Este foi mantido a -20°C até o momento da sua utilização.

Para PCR em tempo real, dosagem de citocinas e determinação da atividade de arginase foram usadas placas de cultivo celular de 35 x 10 mm, nas quais foram adicionados 1 mL de meio RPMI com 20% de SFB + 1 mL de células na concentração entre $1-4 \times 10^6$ /mL, ficando a cultura com 10% de SFB. As placas foram colocadas em estufa a 37°C, atmosfera de 5% de CO₂, overnight. Após esse período, as placas de cultura foram lavadas com PBS a 37°C para retirar as células não aderentes.

Estes macrófagos recém-isolados foram infectados com promastigotas de fase estacionária nas concentrações adequadas (proporção de 5:1), a 37°C, atmosfera de 5% de CO₂. Após quatro horas, a placa foi lavada para retirar os parasitos não interiorizados e incubada com RPMI contendo 10% de SFB.

No ponto de cultivo de 12 horas seguiu-se o protocolo de extração de RNA para posterior realização da RT-PCR e coletou-se o sobrenadante das culturas de 12, 24 e 48 horas para posterior dosagem de citocinas; nos tempos de infecção de 24 e 72 horas seguiu-se o protocolo de determinação da atividade de arginase.

5.6 Determinação da carga parasitária intracelular e da taxa de infecção de macrófagos

Para realizar a quantificação da infecção por microscopia ótica, as lâminas foram coradas com o kit de coloração InstantProv (NewProv, Pinhais, PR, Brasil). Após a coloração, a carga parasitária intracelular foi quantificada por observação através de microscopia ótica (100x, Axioskop, Carl Zeiss International) em três poços. Trezentas células em três poços foram examinadas para a determinação do número médio de parasitos intracelulares por 100 células e da porcentagem de macrófagos infectados (taxa de infecção).

5.7 Avaliação da produção de NO

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados pelas cepas em estudo foram coletados e mantidos a -20°C até o momento da utilização. A produção de NO foi avaliada indiretamente pela medida da produção de nitrito (NO₂⁻) no sobrenadante das culturas. A concentração de nitrito foi determinada através de

reação colorimétrica de Griess (Green *et al.*, 1982). Resumidamente, alíquotas de 80 μL das amostras foram depositadas em poços de placa de 96 poços de fundo plano (Nunc, Naperville, EUA), em triplicata. Em seguida, adicionou-se 80 μL do reagente de Griess (0,1% de N-1-naftiletilenodiamina em solução de ácido fosfórico 5% e sulfanilamida 1%) em cada poço. Incubou-se a placa ao abrigo da luz, a temperatura ambiente durante 10 minutos. Após esse período, a absorbância foi determinada a 540 nm em espectrofotômetro modelo 6405 (Jenway). A dosagem foi determinada através de uma curva padrão de solução de NaNO_2 200 μM . Sobrenadantes de culturas de macrófagos não infectados foram utilizados como controle.

5.8 Determinação da atividade de arginase

A atividade de arginase foi medida como previamente descrito (Corraliza *et al.*, 1994), com algumas modificações. Resumidamente, 10^6 células previamente lavadas em solução de sucrose 0,25 M e KCl 5 mM foram adicionadas a 0,5 mL de Triton X-100 a 0,1% em um tampão antiproteolítico contendo fluoreto de fenilmetilsulfonila a 0,1 mM, 0,01% (p/v) de leupeptina, 0,2 mg/mL de inibidor de tripsina e 1 mM de benzamidina em sucrose 0,25 M e KCl 5 mM. A mistura foi então agitada por 30 minutos a temperatura ambiente. Depois da lise das células, 0,5 mL de Tris-HCL 25 mM contendo MnCl_2 5 mM, pH 7,4, foi adicionado e a enzima foi ativada por 10 minutos a 56°C. A hidrólise da L-arginina foi iniciada através da adição de 25 μL de L-arginina 0,5 M, pH 9,7, a uma alíquota de 25 μL do lisado previamente ativado. Foi então efetuada incubação a 37°C por 60 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 400 μL de uma mistura ácida contendo H_2SO_4 , H_3PO_4 e H_2O (1:3:7). A quantidade de ureia produzida foi medida através da adição de 25 μL de α -isonitrosopropiofenona a 9% (dissolvida em etanol) e aquecimento subsequente a 100°C por 45 minutos. Alíquotas de 300 μL das amostras foram depositadas em placa de 96 poços, que foi incubada ao abrigo da luz, a temperatura ambiente, por 10 minutos. Em seguida, a absorbância foi determinada a 540 nm em espectrofotômetro modelo 6405 (Jenway). Uma curva de calibração foi preparada com quantidades crescentes de ureia em concentrações variando entre 1,5 a 30 $\mu\text{g/mL}$.

5.9 Dosagem de citocinas e quimiocinas em sobrenadantes dos macrófagos infectados por Luminex

A dosagem de citocinas e quimiocinas potencialmente relevantes na imunopatologia das leishmanioses (IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), G-CSF, GM-CSF, KC, RANTES e TNF- α) foi feita em sobrenadantes colhidos após 12, 24 e 48 horas de cultivo *in vitro* dos macrófagos e infectados com as cepas em estudo, utilizando-se o kit Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Group I 12-Plex Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), segundo as instruções do fabricante. Sobrenadantes de culturas de células não infectadas foram utilizados como controle.

5.10 Dosagem de TNF- α por ELISA

A quantificação do TNF- α foi feita em sobrenadantes de cultura de macrófagos murinos infectados *in vitro* com as cepas em estudo através do ELISA (BD Pharmingen and R&D Systems, Minneapolis, MN), segundo as instruções do fabricante. Placas de 96 poços de fundo chato (NUNC) foram recobertas com 50 μ L do anticorpo de captura específico para TNF- α , diluído em PBS por 16 horas a temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com tampão de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS) e bloqueados com 1% de BSA diluído em PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados três vezes e foram adicionados 50 μ L de concentrações conhecidas de TNF- α recombinante, para a geração da curva padrão, diluídas em reagente diluente. Também foram adicionados 50 μ L da amostra de sobrenadantes das culturas. Incubou-se durante 2 horas a temperatura ambiente, seguida de três lavagens. Depois foram adicionados 50 μ L do anticorpo de detecção específico para TNF- α , conjugado a biotina e diluído em reagente diluente. Incubou-se a placa durante 2 horas a temperatura ambiente. Os poços foram lavados mais três vezes e incubados com 50 μ L de estreptoavidina conjugada a peroxidase, diluída a 1:200 em reagente diluente por 20 minutos a temperatura ambiente. Após mais três lavagens, a atividade da peroxidase foi revelada com peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina (TMB; LGC Biotecnologia) em um volume final de 100 μ L. Interrompeu-se a reação colorimétrica com 50 μ L de ácido sulfúrico a 2,5N e fez-se

a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro usando o programa SOFTmax®PRO 4.0 (Life Sciences Edition, Molecular Devices Corporation) a 450 nm. Após a leitura, os resultados foram analisados com base na confecção da curva padrão. As dosagens foram feitas em duplicatas. Sobrenadantes de culturas de células não infectadas foram utilizados como controle.

5.11 PCR Multiplex em tempo real

5.11.1 Extração de RNA de lisados de macrófagos

Lisados de macrófagos infectados com as cepas de *Leishmania* em estudo foram utilizados para extração de RNA no ponto de cultivo de 12 horas.

O sobrenadante das placas de cultivo celular de 35 x 10 mm foi coletado para dosagem de citocinas. Em seguida, adicionou-se 1 mL de Trizol (Life Technologies/Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em cada placa para lisar as células. As amostras foram armazenadas em eppendorf de 1,5 mL a -70°C até o momento da sua utilização.

Posteriormente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck, Alemanha) e as amostras foram agitadas manualmente. Centrifugou-se a 12000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante (fase aquosa superior) foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, no qual foi adicionado 500 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA). As amostras foram homogeneizadas e armazenadas a -70°C overnight.

Posteriormente, foi adicionado 1 µL de corante GlycoBlue (Ambion/Applied Biosystems, Austin, TX, EUA) e as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado (com o auxílio de bomba de sucção) e o pellet foi seco à temperatura ambiente (25°C) por cerca de 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 500 µL de etanol (Merck, Alemanha) 70% e centrifugado a 10000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado (com o auxílio de bomba de sucção) e o pellet foi seco à temperatura ambiente (25°C) por cerca de 10 minutos.

Após 10 minutos, o pellet (RNA) foi ressuspensão em 20 µL de água RF (do inglês RNase free, água tratada livre de RNases) e armazenado a -70°C até o momento da sua utilização.

5.11.2 Quantificação de ácidos nucléicos

Os ácidos nucléicos extraídos foram quantificados com a utilização de espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Para isso, 1,5 µL da amostra foi lido contra um “branco” contendo água RF. A concentração foi definida a partir de valores de absorbância no comprimento de onda de 260 nm. Para avaliar a pureza das amostras, utilizou-se a razão da absorbância em dois comprimentos de onda: 260/280.

5.11.3 Verificação da qualidade do RNA

A qualidade do RNA extraído foi avaliada por gel de agarose (Life Technologies/Invitrogen) a 1,2% (p/v) desnaturante. As amostras foram preparadas da seguinte forma: misturou-se 7 µL de amostra (0,5-1,0 µg de RNA) + 7 µL de mix de amostra, homogeneizou-se e levou-se ao banho seco por 10 minutos a 65°C. As amostras foram mantidas em banho de gelo, coradas com 1 µL de SYBR Green II 100X (Life Technologies/Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) e posteriormente aplicadas no gel. Após eletroforese, o gel foi analisado por um sistema de fotodocumentação (L-Pix Touch, Locus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil).

5.11.4 Transcrição reversa

A transcrição do RNA em cDNA foi realizada em um volume final de reação de 20 µL. Inicialmente, 100 ng de RNA em solução aquosa foram misturados com 0,5 µg de oligo(dT) (Thermo Scientific/Fermentas, St. Leon-Rot, Alemanha). Em seguida, foi adicionado a essa mistura o tampão da enzima em concentração final de 10 mM dNTP, 20 U do inibidor de RNase RiboLock® e 200 U da enzima RevertAid H Minus M-MuIV Reverse Transcriptase® (todos da Thermo Scientific/Fermentas, St. Leon-Rot, Alemanha). Esta mistura foi incubada a 42°C por 1 hora para realização da transcrição e, em seguida, a 70°C durante 5 minutos para a inativação da enzima. Todas as etapas de incubação foram realizadas em banho-seco modelo DB- Heat & Cool (Locus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil).

5.11.5 Desenho de iniciadores

Todos os oligonucleotídeos utilizados na PCR em tempo real foram desenhados a partir de sequências de referência de cada gene (RefSeq) utilizando o

software Primer3 v.0.4.0. Estas sequências foram validadas pela ferramenta Primer-BLAST usando o banco de genes de camundongos do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome). Os pares de oligonucleotídeos utilizados no estudo foram definidos de acordo com as buscas de genes associados a inflamação e resposta imune (Apêndice A).

5.11.6 Reação de PCR Multiplex em tempo real

No presente estudo, a expressão gênica foi avaliada por meio da tecnologia de qRT-PCR Multiplex em sistema microfluídica da Fluidigm. Utilizou-se 21 genes (Apêndice A) para uma análise simultânea de 86 amostras. Para cada amostra foi amplificado o cDNA dos genes de interesse, além dos genes constitutivos B2M, GAPDH e BACT. As amostras consistem em lisados de macrófagos infectados com as cepas em estudo na proporção de infecção de 5:1.

O sistema Biomark consiste em um sistema microfluidico, que define 9216 pontos com poços de 8 nL possibilitando a amplificação simultânea de 96 amostras por 96 oligonucleotídeos. Primeiramente, cada uma das amostras (100 ng de cDNA) foi pré-amplificada com um pool de 21 oligonucleotídeos (Apêndice A) em um termociclador convencional (Gene Amp PCR System 9700, Life Technologies/Applied Biosystems, EUA). Para isso, foi utilizado 2,5 µL do TaqMan preAmp Master mix (Life Technologies/Applied Biosystems, EUA) na presença de 200 nM de cada oligonucleotídeo e 1,25 µL de cada cDNA em um volume final de 5 µL. A reação ocorreu nas seguintes condições: 95°C por 10 minutos, seguido de 14 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

Posteriormente, o cDNA pré-amplificado foi colocado no controlador de fluídos e depois amplificado no sistema Biomark (Fluidigm, EUA). Para a realização desta amplificação, 2 µL de cada cDNA pré-amplificado foi misturado a 2,5 µL de 2x Taqman Gene Expression Master mix (Life Technologies/Applied Biosystems, EUA) e 0,25 µL de 20x EvaGreen DNA binding dye (Life Technologies/Applied Biosystems, EUA). Em seguida, os 20 µM de cada par de oligonucleotídeo foram misturados a 2,5 µL de 2x Assay Loading Reagent (Life Technologies/Applied Biosystems, EUA) em 5 µL de volume final. O cDNA pré-amplificado e os iniciadores foram adicionados na placa (96.96 Dynamic Array IFC, Fluidigm, EUA) (Figura 5.1), em seus respectivos poços.

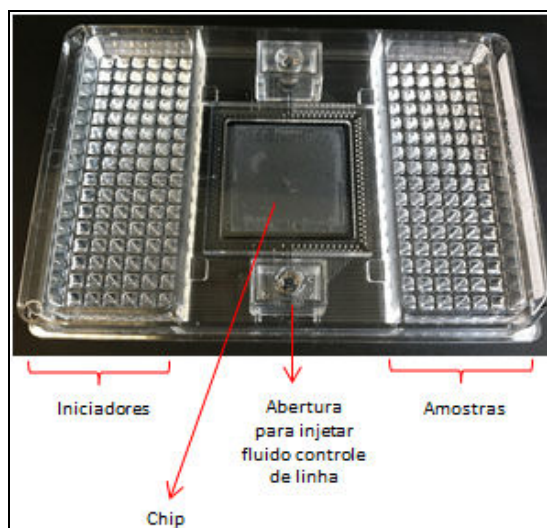


Figura 5.1. Placa utilizada no PCR Multiplex em tempo real.

Posteriormente a placa foi colocada no IFC Controller MX (Fluidigm, EUA) para que o chip fosse carregado. Em seguida, a placa foi transferida para o termociclador Biomark (Fluidigm, EUA) para a amplificação simultânea das 86 amostras.

5.11.7 **Análise estatística dos dados de PCR Multiplex em tempo real**

A partir dos dados de acúmulo de fluorescência das triplicatas da reação de PCR Multiplex em tempo real de cada amostra, foi utilizado o ajuste de função logística, ou curva sigmóide de quatro parâmetros, para representar cada curva de amplificação, usando a biblioteca de funções qpcR (Ritz e Spiess, 2008) para a linguagem estatística R (R Development Core Team, 2013) versão 3.01. O ciclo de quantificação, ou C_q , foi determinado como o ciclo relativo ao ponto de máxima da primeira derivada da curva sigmóide ajustada (ponto característico, ou *crossing point* (C_p)). O uso desse ponto de máxima característico é conveniente uma vez que ele se encontra numa região de eficiência constante na fase exponencial da curva de amplificação, além de ser invariante do poço e placa aonde ocorre a reação de RT-PCR de tempo real (Rebrikov *et al.*, 2006). A eficiência de cada reação de amplificação foi calculada como a razão entre a fluorescência do ciclo de quantificação e a fluorescência do ciclo anterior a esse. A eficiência estimada de cada gene foi obtida pela eficiência média das eficiências calculadas para cada reação de amplificação daquele gene. Os genes empregados na normalização entre as

diferentes amostras amplificadas foram selecionados pelo método geNorm (Vandesompele *et al.*, 2003). O algoritmo do geNorm parte do pressuposto de que os genes com expressão mais estável em relação aos outros genes analisados são os mais adequados para normalização interna. Para a comparação de médias dos valores de expressão normalizados entre os grupos foi utilizado one-way ANOVA não paramétrica via permutação irrestrita (n=1000), seguido da comparação de médias par-a-par por teste t não paramétrico via permutação (n=1000) com correção de Bonferroni (Basso *et al.*, 2009). Os dados são apresentados pela média \pm erro padrão da média. Níveis de significância bi-caudais menores ou iguais a 0,05 e 0,1 foram considerados como significantes e sugestivos, respectivamente.

5.12 Análise estatística dos demais resultados

Foi realizada com auxílio do programa Prism 5 (GraphPad software, San Diego, CA, USA), utilizando-se testes não paramétricos: teste de Fisher, Kruskal-Wallis, Mann Whitney, comparação múltipla de Dunn e coeficiente de correlação de Spearman. O nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Isolamento de amastigotas de lesão de coxim plantar de hamster

Levando em consideração que a CLIOC não possui controle sobre o número de passagens *in vitro* das cepas e, visando homogeneizar as condições de infectividade das mesmas, todas elas foram utilizadas somente após passagem em hamster.

As cepas levaram em média quatro meses para produzir lesão subcutânea. As informações sobre as cepas e o desenvolvimento de lesões subcutâneas encontram-se dispostas na Tabela 6.1.

Tabela 6.1. Informações sobre as cepas obtidas da CLIOC referentes às espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, desenvolvimento de lesão (sim ou não) e sucesso do isolamento da cepa (sim ou não).

CEPAS	Presença de lesão		Isolamento da cepa	
	Sim	Não	Sim	Não
<i>L. (L.) amazonensis</i>				
MHOM/BR/1977/LTB0016	X		X	
IFLA/BR/1967/PH8	X		X	
MHOM/BR/2011/S55	X		X	
MHOM/BR/2003/NJS	X		X	
<i>L. (V.) braziliensis</i>				
MCAN/BR/1998/R619	X		X	
MHOM/BR/2000/LTCP13396	X		X	
MHOM/BR/2002/NMT-RBO005	X		X	
MHOM/BR/2011/RSG		X	X	
MHOM/BR/2010/S29		X		X
MHOM/BR/2010/LMA		X		X

Nota: MCAN = cepa isolada em cão; MHOM = cepa isolada em humano; IFLA = cepa isolada em fletobomíneo.

Como descrito na Tabela 6.1, três cepas de *L. (V.) braziliensis*, MHOM/BR/2011/RSG, MHOM/BR/2010/S29 e MHOM/BR/2010/LMA não produziram

lesões cutâneas. Neste caso, foi feita uma tentativa de isolamento a partir do linfonodo poplíteo conforme descrito no item 5.3 de Material e Métodos. No entanto, dentre as três cepas citadas, apenas a cepa MHOM/BR/2011/RSG foi isolada desta forma com sucesso.

Constatou-se que apenas três cepas de *L. (V.) braziliensis* geraram lesões cutâneas (50%), enquanto todas as cepas de *L. (L.) amazonensis* as produziram (100%), porém, sem diferença estatisticamente significativa.

6.2 Curvas de crescimento

Foram feitas curvas de crescimento em meio Schneider para cada cepa utilizada no estudo visando identificar o primeiro dia da fase estacionária para realização da infecção de macrófagos.

A análise das curvas de crescimento das cepas de *L. (L.) amazonensis* MHOM/BR/1977/LTB0016, IFLA/BR/1967/PH8, MHOM/BR/2011/S55, MHOM/BR/2003/NJS e *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/2011/RSG (Figura 6.1 A-E) mostrou que estas cepas apresentaram uma fase de crescimento exponencial ou logarítmica (fase log) com intervalo de 2 dias de cultura, atingindo a fase estacionária no 3º dia de cultivo. Desse modo, as infecções de macrófagos com estas cepas foram realizadas no 3º dia de cultura das mesmas.

A avaliação das curvas de crescimento das cepas de *L. (V.) braziliensis* MCAN/BR/1998/R619, MHOM/BR/2000/LTCP13396 e MHOM/BR/2002/NMT-RBO005 (Figura 6.1 F-H) mostrou que as cepas apresentaram uma fase de crescimento exponencial ou logarítmica (fase log) com intervalo de 3 dias de cultura, atingindo a fase estacionária no 4º dia de cultivo. Sendo assim, as infecções de macrófagos com estas cepas foram realizadas no 4º dia de cultivo.

Conforme mostra a Figura 6.1, constatou-se que todas as cepas de *L. (L.) amazonensis* atingiram a fase estacionária no 3º dia de cultivo, enquanto as cepas de *L. (V.) braziliensis*, com exceção da cepa MHOM/BR/2011/RSG (3º dia de cultivo), atingiram a fase estacionária no 4º dia de cultura. Não foi observada diferença estatística entre as duas espécies quanto ao dia de alcance da fase estacionária.

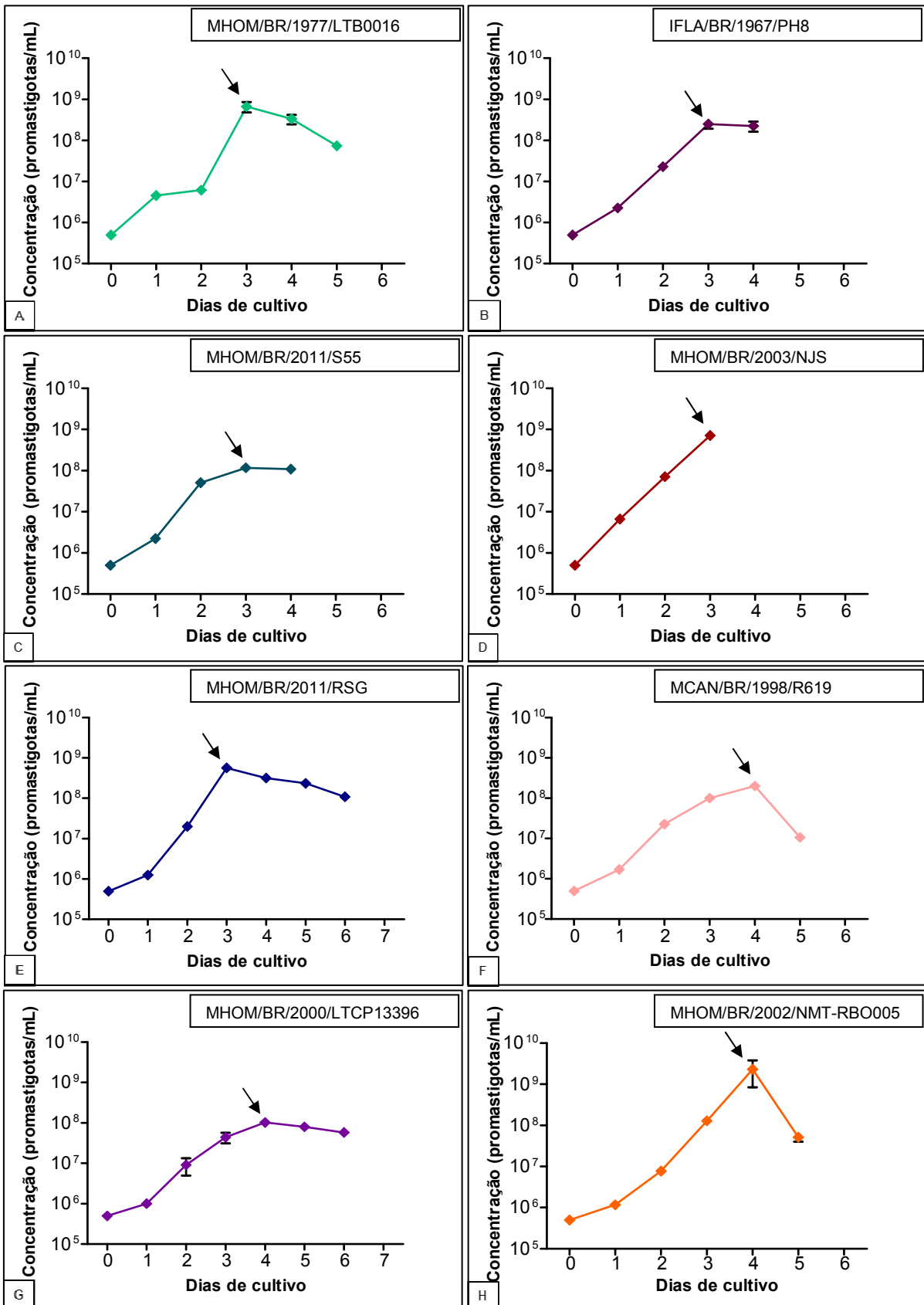


Figura 6.1. Curvas de crescimento das cepas de *L. (L.) amazonensis* (A-D) e de *L. (L.) braziliensis* (E-H) em meio Schneider. Inóculo com $5,0 \times 10^5$ promastigotas/mL. Cada ponto representa a média da contagem de parasitos/mL/dia de três culturas. A seta indica a fase estacionária. As barras representam o erro padrão.

6.3 Determinação da carga parasitária intracelular e taxa de infecção de macrófagos

A suscetibilidade dos macrófagos às diferentes cepas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* foi avaliada por meio da determinação da carga parasitária intracelular e da taxa de infecção de macrófagos infectados com as cepas em estudo.

Primeiramente, realizou-se um ensaio preliminar com o objetivo de determinar a melhor proporção de *Leishmania*/macrófagos para os ensaios de infecção. Desse modo, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram isolados e infectados com promastigotas em fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1977/LTB0016) nas proporções de infecção de 5:1 e de 10:1 nos tempos de infecção de 24, 48 e 72 horas (Figura 6.2). A carga parasitária intracelular foi quantificada por microscopia ótica. A proporção de 5:1 foi escolhida visto que, na proporção 10:1 não foi possível determinar as taxas de infecção, devido à superinfecção que destruiu todos os macrófagos (não sendo possível, portanto, realizar a quantificação).

Imagens das infecções para cada cepa nos tempos de cultivo de 24 horas são representadas na Figura 6.3. A quantificação da infecção foi realizada através de microscopia ótica, que permitiu observar macrófagos reativos contendo vacúolos parasitóforos, contendo formas amastigotas de *Leishmania* sp., no seu citoplasma. A partir da microscopia, verificou-se que as células infectadas por *L. (L.) amazonensis* (Figura 6.3 A, C e D) possuem vacúolos parasitóforos maiores contendo maior número de parasitas do que os macrófagos infectados com *L. (V.) braziliensis* (Figura 6.3 E, F, G e H). A Figura 6.3 B, mostra a infecção pela cepa IFLA/BR/1967/PH8, que apesar de ser *L. (L.) amazonensis*, possui vacúolos parasitóforos pequenos e com escassez de amastigotas intracelulares.

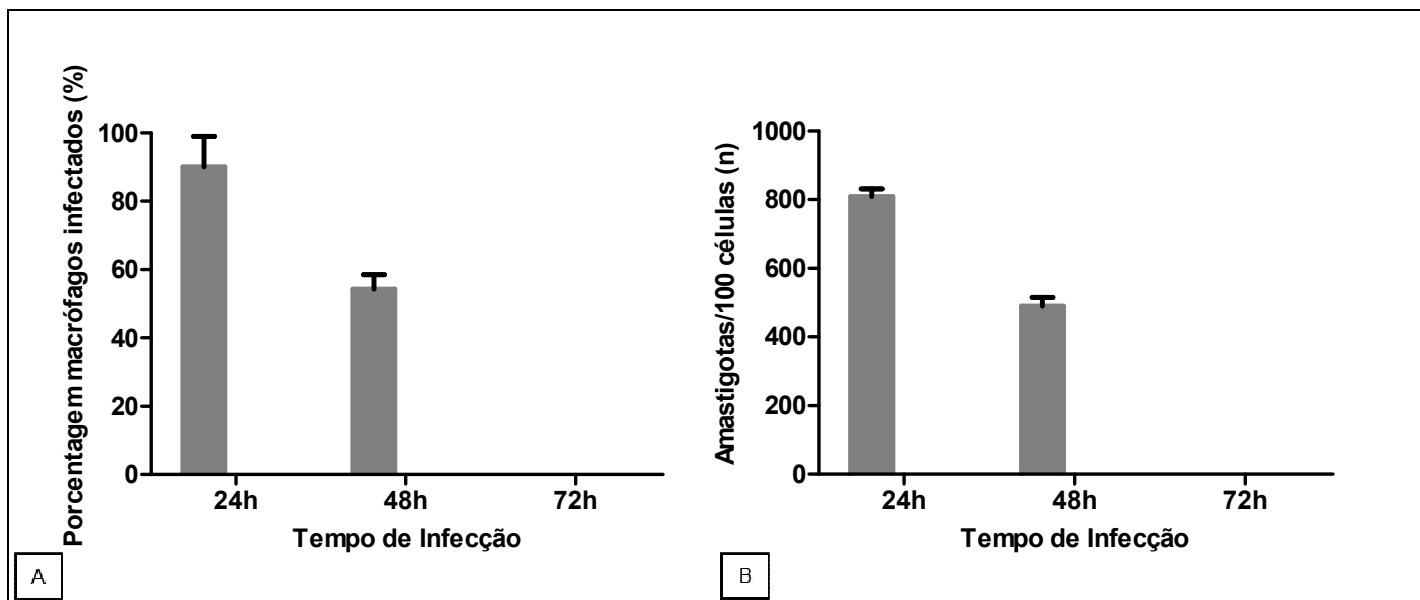


Figura 6.2. Estabelecimento da proporção de infecção de macrófagos. A: Porcentagem de macrófagos infectados. B: Número de amastigotas/100 células. Culturas de macrófagos murinos infectados *in vitro* por *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1977/LTB0016) na proporção de 5:1 (barra cinza) promastigotas em fase estacionária/macrófago nos tempos de cultivo de 24, 48 e 72 horas. Dados representam média de triplicatas \pm erro padrão. Análise estatística foi realizada utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

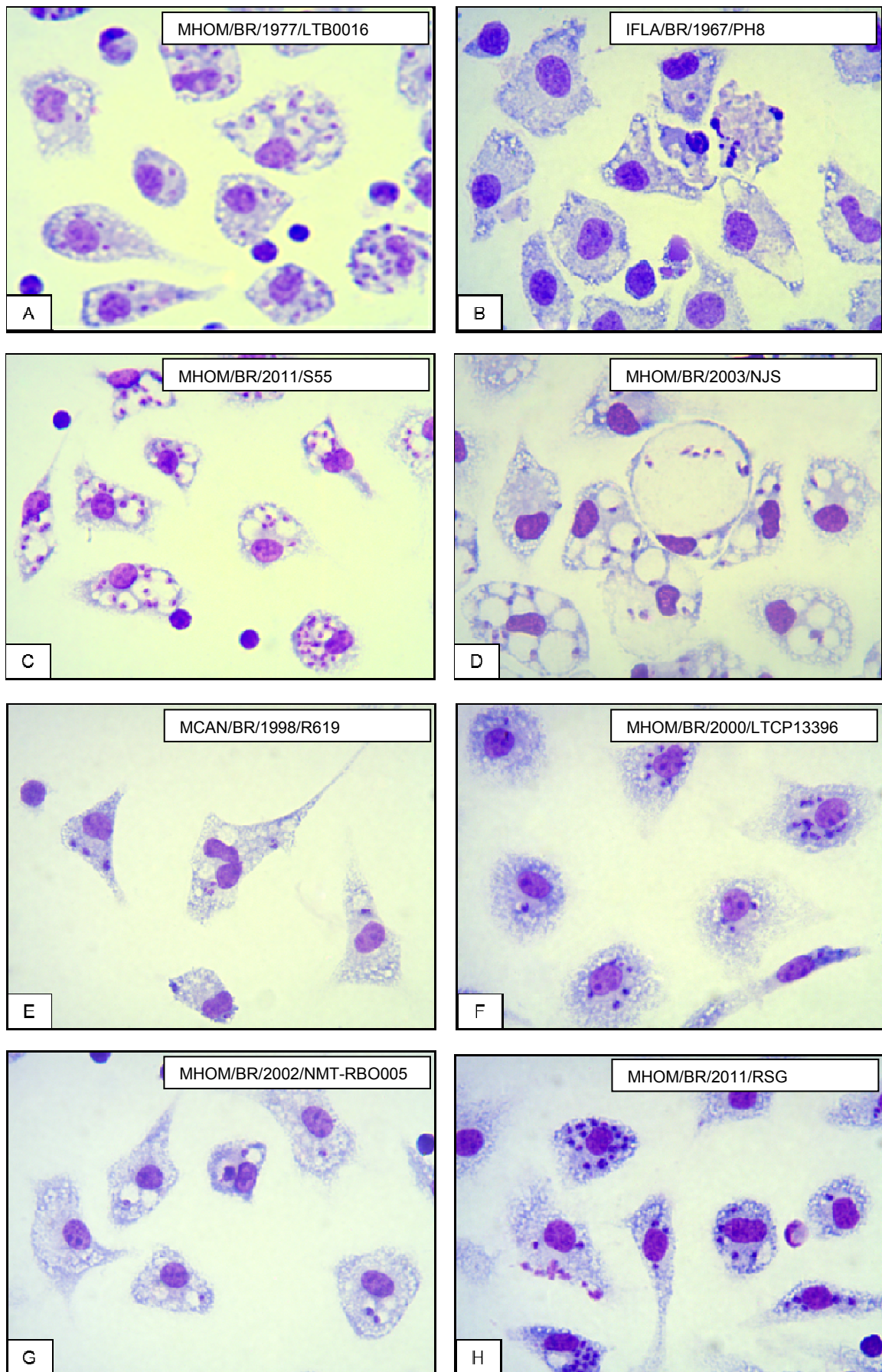


Figura 6.3. Microscopia óptica de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados *in vitro* com cepas de *L. (L.) amazonensis* (Figuras A-D) e de *L. (V.) braziliensis* (Figuras E-H) com taxa de infecção de 5:1 promastigotas em fase estacionária/macrófago. Tempo de cultivo de 24 horas.

A porcentagem de infecção de macrófagos foi bastante variável entre as diferentes cepas (Figura 6.4). Observou-se que a cepa IFLA/BR/1967/PH8 apresentou uma taxa de infecção de macrófagos (8,56%) muito abaixo das demais cepas de *L. (L.) amazonensis* (taxas variaram entre 64-98%), tendo sido encontrada uma diferença altamente significativa entre as cepas IFLA/BR/1967/PH8 e MHOM/BR/2011/NJS ($p= 0,0111$).

Em seguida, foi feita uma análise da porcentagem de macrófagos infectados entre as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* (Figura 6.5). Constatou-se que não houve diferença significativa entre as espécies.

O número de amastigotas/100 macrófagos foi aparentemente similar entre as diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis*, havendo uma variação maior em relação as cepas de *L. (L.) amazonensis*, porém sem diferença estatisticamente significativa (Figura 6.6).

Assim, como foi observado em relação à porcentagem de macrófagos infectados, não houve diferença significativa entre o número de amastigotas intracelulares em macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis* e por *L. (V.) braziliensis* (Figura 6.7).

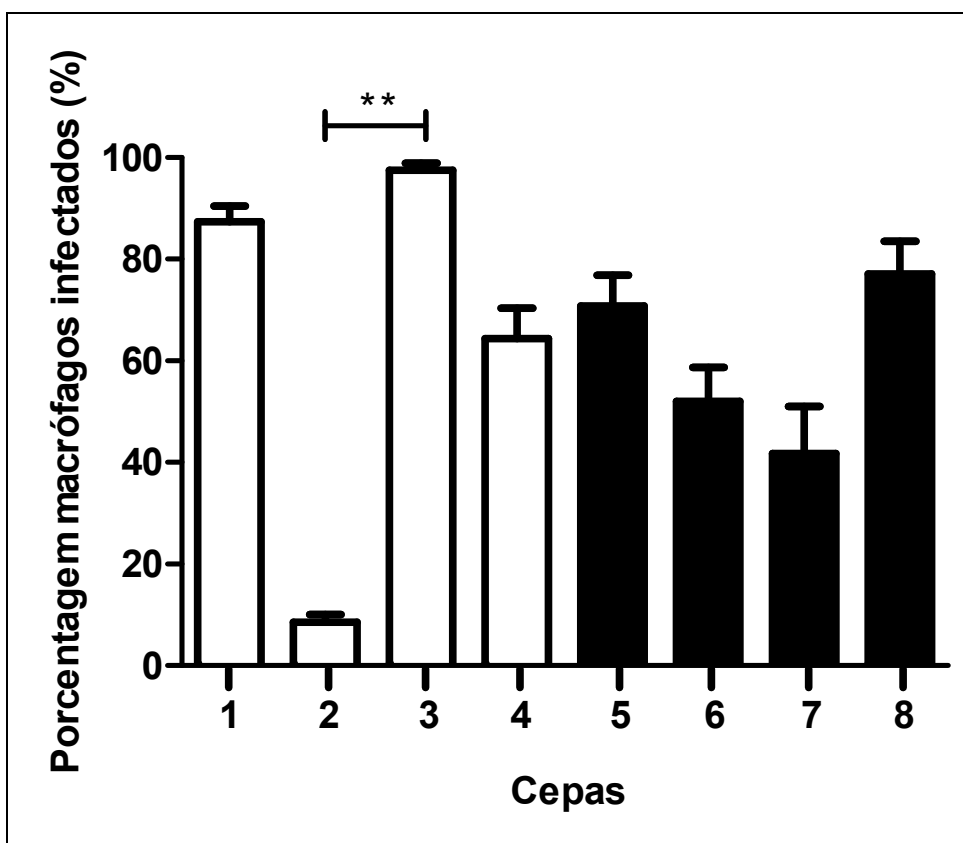


Figura 6.4. Porcentagem de macrófagos infectados. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados *in vitro* com cepas de *L. (L.) amazonensis* (barra branca) e de *L. (V.) braziliensis* (barra preta) com taxa de infecção de 5:1 promastigotas em fase estacionária/macrófago. A porcentagem de macrófagos infectados foi avaliada após 24h de infecção. Dados representam a média dos resultados de três experimentos independentes \pm desvio padrão. Análise estatística foi realizada utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. (**p= 0,0111). 1:MHOM/BR/1977/LTB0016; 2:IFLA/BR/1967/PH8; 3:MHOM/BR/2011/S55; 4:MHOM/BR/2003/NJS; 5:MCAN/BR/1998/R619; 6:MHOM/BR/2000/LTCP13396; 7:MHOM/BR/2002/NMT-RBO005; 8:MHOM/BR/2011/RSG.

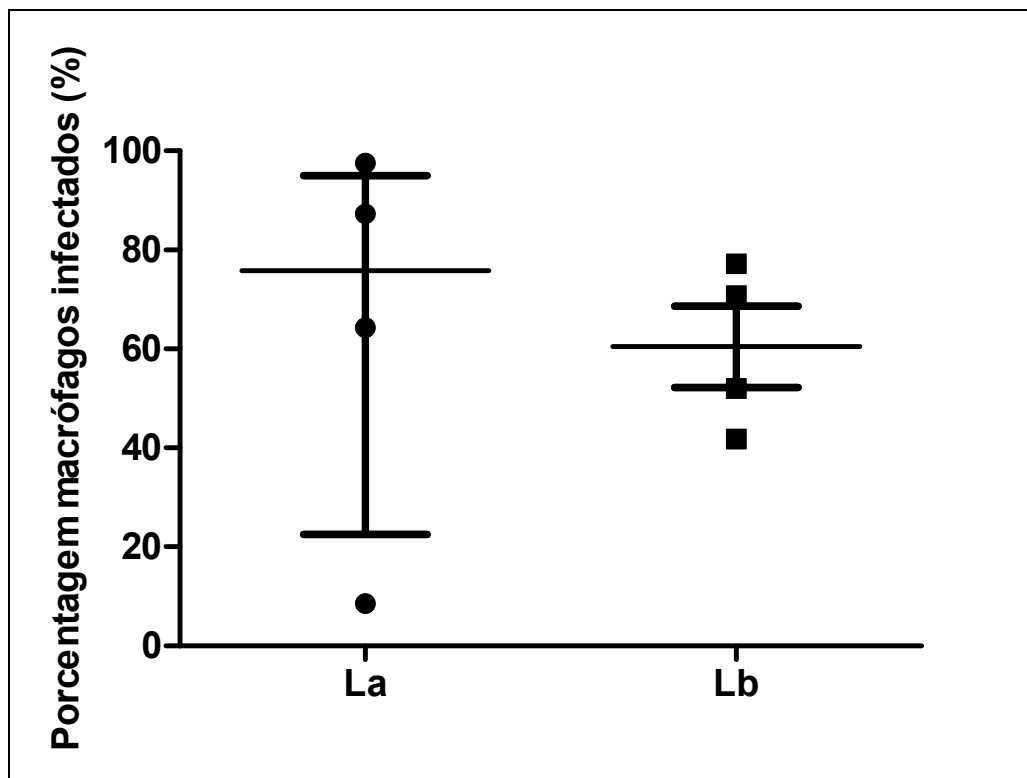


Figura 6.5. Porcentagem de macrófagos infectados. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados *in vitro* com 4 cepas de *L. (L.) amazonensis* (La) e 4 cepas de *L. (V.) braziliensis* (Lb) com taxa de infecção de 5:1 promastigotas em fase estacionária/macrófago. A porcentagem de macrófagos infectados foi avaliada após 24h de infecção. Cada símbolo representa uma cepa e cada linha representa a mediana do grupo. Dados representam a média dos resultados de três experimentos independentes. Para análise estatística, o teste não paramétrico de Mann Whitney foi utilizado.

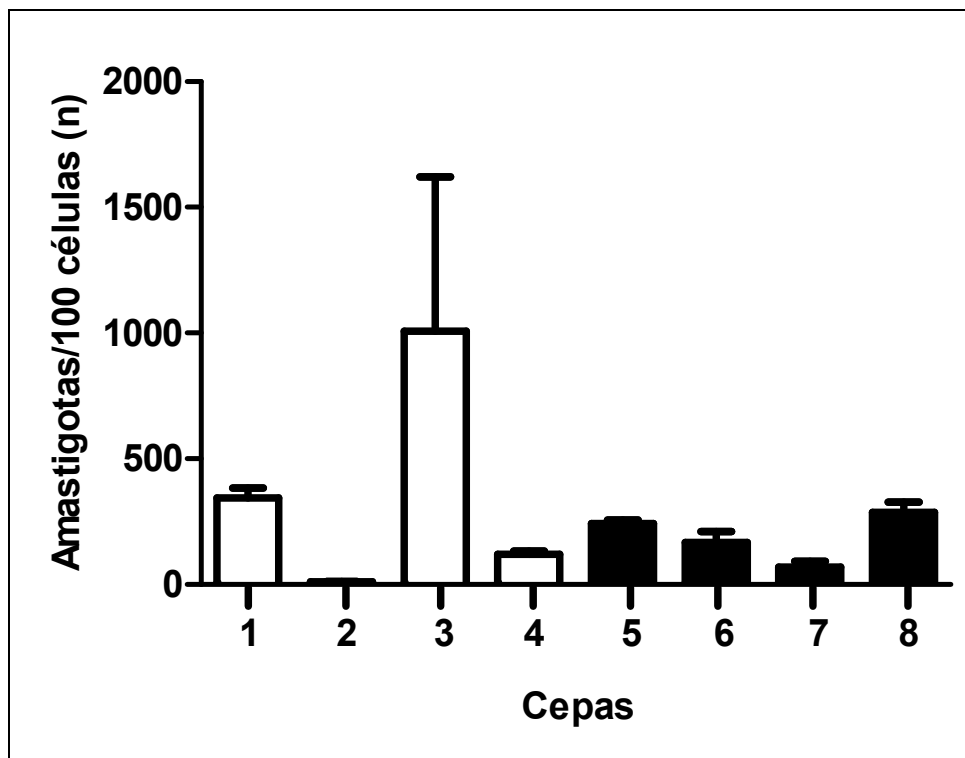


Figura 6.6. Carga parasitária intracelular. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados *in vitro* com cepas de *L. (L.) amazonensis* (barra branca) e de *L. (V.) braziliensis* (barra preta) com taxa de infecção de 5:1 promastigotas em fase estacionária/macrófago. A carga parasitária intracelular foi avaliada após 24h de infecção. Dados representam a média dos resultados de três experimentos independentes \pm desvio padrão. Análise estatística foi realizada utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. 1:MHOM/BR/1977/LTB0016; 2:IFLA/BR/1967/PH8; 3:MHOM/BR/2011/S55; 4:MHOM/BR/2003/NJS; 5:MCAN/BR/1998/R619; 6:MHOM/BR/2000/LTCP13396; 7:MHOM/BR/2002/NMT-RBO005; 8:MHOM/BR/2011/RSG.

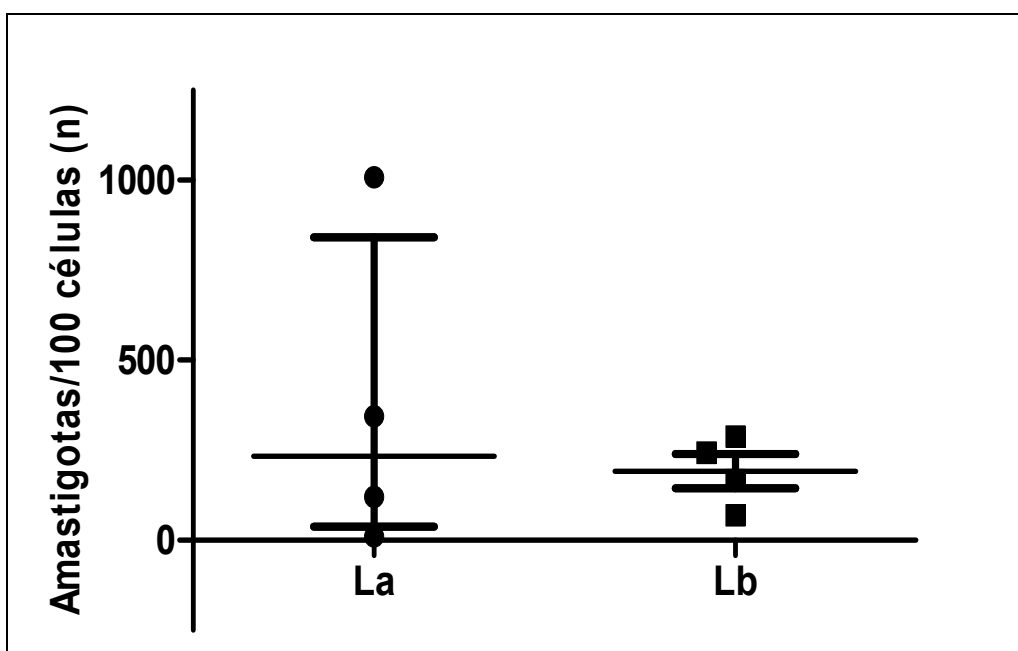


Figura 6.7. Carga parasitária intracelular. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados *in vitro* com 4 cepas de *L. (L.) amazonensis* (**La**) e 4 cepas de *L. (V.) braziliensis* (**Lb**) com taxa de infecção de 5:1 promastigotas em fase estacionária/macrófago. A porcentagem de macrófagos infectados foi avaliada após 24h de infecção. Cada símbolo representa uma cepa e cada linha representa a mediana do grupo. Dados representam a média dos resultados de três experimentos independentes. Para análise estatística, o teste não paramétrico de Mann Whitney foi utilizado.

Diferentemente das cepas de *L. (L.) amazonensis* MHOM/BR/2011/S55 e MHOM/BR/2003/NJS, obtidas da CLIOC, as cepas MHOM/BR/1977/LTB0016 e IFLA/BR/1967/PH8, já vinham sendo mantidas em laboratório há alguns anos, com passagens periódicas em camundongos para manutenção da virulência. Para que todas as cepas estivessem sobre as mesmas condições para a realização dos experimentos, todas as cepas foram inoculadas e isoladas de hamsters. No entanto, como demonstrado nas Figuras 6.4 e 6.6, a cepa IFLA/BR/1967/PH8 apresentou uma baixa porcentagem de macrófagos infectados (8,56%) e um baixo número de amastigotas/100 macrófagos ($n= 10,89$) em comparação com as demais cepas de *L. (L.) amazonensis*.

Estudos anteriores realizados pela equipe do laboratório demonstraram que a cepa IFLA/BR/1967/PH8 isolada de camundongo apresenta uma alta taxa de infecção de macrófagos e um número elevado de amastigotas/100 macrófagos, diferindo dos resultados obtidos pela infecção de macrófagos com a mesma cepa isolada de hamster.

Desse modo, a fim de avaliar se a origem da cepa IFLA/BR/1967/PH8 poderia estar interferindo na infecção de macrófagos, realizou-se um experimento, no qual macrófagos foram infectados com cepas IFLA/BR/1967/PH8 provenientes do isolamento de camundongos BALB/c e de hamster (Figura 6.8). As cepas foram caracterizadas pela CLIOC (Anexo B). Observou-se uma aparente diferença entre as taxas de infecção (camundongo = $62,33\% \pm 5,51$; hamster = $14,67\% \pm 8,51$) e entre o número de amastigotas/100 macrófagos (camundongo: $n= 156,7 \pm 39,32$; hamster: $n= 26,33 \pm 18,56$), porém como o número de observações (triplicata técnica de um único experimento) foi pequeno, não foi possível realizar análise estatística.

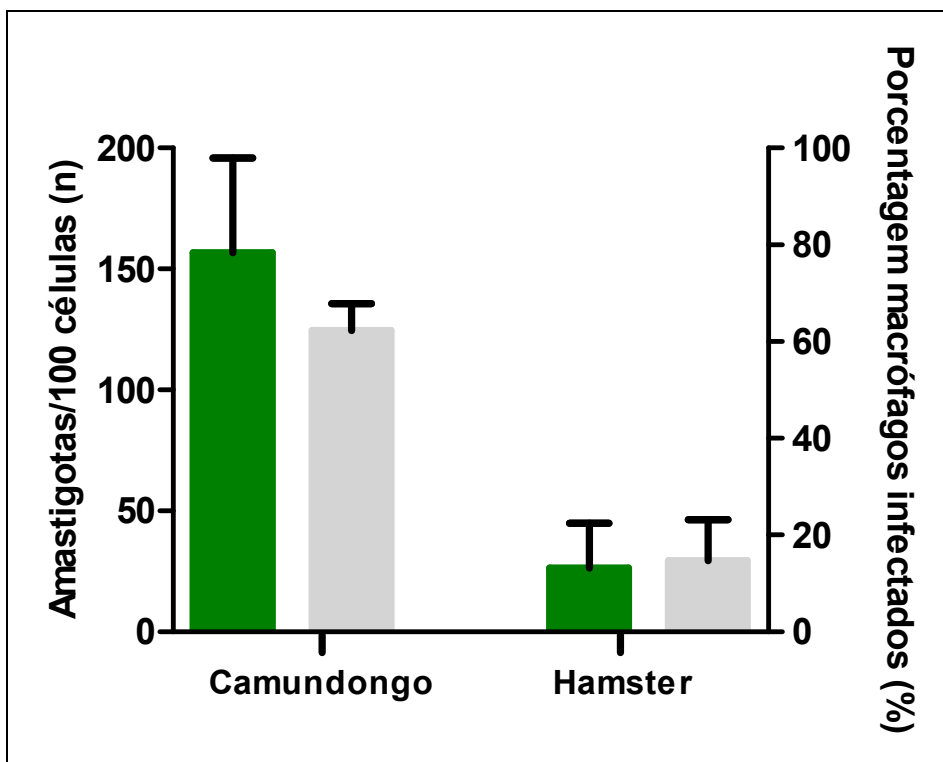


Figura 6.8. Diferença entre as cepas IFLA/BR/1967/PH8 isoladas de camundongo e de hamster. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados *in vitro* com as cepas IFLA/BR/1967/PH8 isoladas de camundongo e de hamster com taxa de infecção de 5:1 promastigotas em fase estacionária/macrófago. A porcentagem de macrófagos infectados (barra cinza) e o número de amastigotas/100 células (barra verde) foram avaliados após 24h de infecção. Dados representam a média dos resultados \pm desvio padrão.

6.4 Avaliação da produção de NO

Primeiramente, realizou-se um ensaio preliminar com a finalidade de estabelecer o tempo de cultivo para a dosagem de NO. Sobrenadantes de culturas de macrófagos murinos infectados com *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1977/LTB0016) foram dosados nos tempos de infecção de 24, 48 e 72 horas. Escolheu-se o tempo de cultivo que apresentou as maiores médias das dosagens para os próximos ensaios, ou seja, o tempo de infecção de 48 horas (Figura 6.9).

Os resultados da dosagem em 48 horas pós-infecção para cada cepa estão representados na Figura 6.10. Os resultados apresentados representam a diferença entre os valores das culturas estimuladas e o da cultura controle não estimulada. Constatou-se que as infecções pelas cepas em estudo induziram uma baixa produção de NO pelos macrófagos em cultura. A cepa de *L. (L.) amazonensis* MHOM/BR/2003/NJS induziu a maior produção de NO; 0,25 μ M; enquanto MHOM/BR/2002/NMT-RBO005 foi a única cepa de *L. (V.) braziliensis* que induziu a produção (0,08 μ M). Não houve diferença significativa entre as cepas.

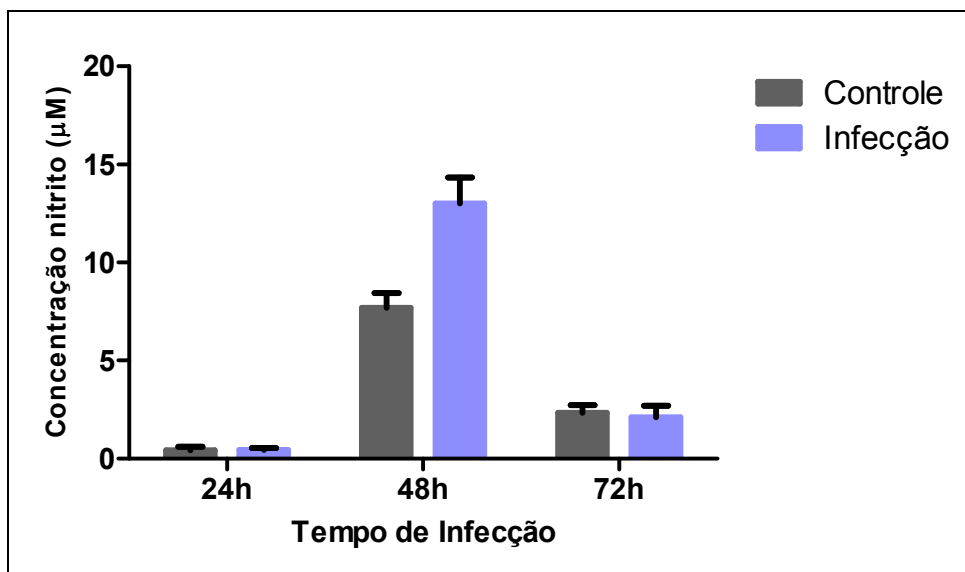


Figura 6.9. Estabelecimento do tempo de infecção para dosagem de NO. Dosagem da concentração de nitrito em sobrenadantes de culturas de macrófagos murinos infectados *in vitro* por *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1977/LTB0016) na proporção de 5:1 promastigotas em fase estacionária/macrófago por meio da reação colorimétrica de Griess. Foram avaliados os tempos de cultivo de 24, 48 e 72 horas. Dados representam média de triplicatas \pm erro padrão. Análise estatística foi realizada utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

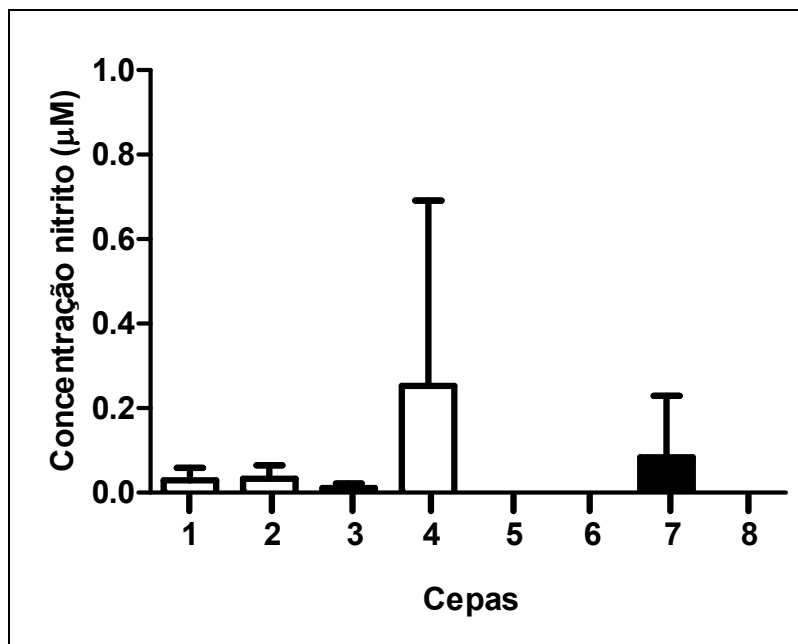


Figura 6.10. Avaliação da produção de NO por meio da reação colorimétrica de Griess. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados *in vitro* com cepas de *L. (L.) amazonensis* (barra branca) e de *L. (V.) braziliensis* (barra preta) com taxa de infecção de 5:1 promastigotas em fase estacionária/macrófago. A concentração de nitrito foi avaliada após 48h de infecção. Resultados apresentados representam a diferença entre os valores das culturas estimuladas e o da cultura controle não estimulada. Dados representam a média dos resultados de três experimentos independentes \pm desvio padrão. Análise estatística foi realizada utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. 1:MHOM/BR/1977/LTB0016; 2:IFLA/BR/1967/PH8; 3:MHOM/BR/2011/S55; 4:MHOM/BR/2003/NJS; 5:MCAN/BR/1998/R619; 6:MHOM/BR/2000/LTCP13396; 7:MHOM/BR/2002/NMT-RBO005; 8:MHOM/BR/2011/RSG.

6.5 Determinação da atividade de arginase

Alguns autores como Corraliza *et al.* (1994), Iniesta *et al.* (2002) e Muleme *et al.*, 2009, demonstraram que a atividade de arginase se correlaciona positivamente ao tempo de infecção. Desse modo, dentre os tempos de infecção de 24, 48 e 72 horas utilizados nos diferentes ensaios deste estudo, escolhemos o tempo de 72 pós-infecção para a determinação dos níveis de ureia.

A avaliação da atividade de arginase está representada na Figura 6.11. Os resultados apresentados representam a diferença entre os valores das culturas estimuladas e o da cultura controle não estimulada. Observa-se uma relativa similaridade entre a atividade de arginase das cepas de *L. (L.) amazonensis* e uma maior variação em relação às cepas de *L. (V.) braziliensis*, com dosagens entre 0-0,67 μM . Não houve diferença significativa entre as cepas em estudo. Constatou-se também não haver diferença interespecífica significativa (Figura 6.12).

Em seguida, fez-se uma análise de correlação entre os níveis de nitrito (48 horas pós-infecção) com os de ureia (72 horas pós-infecção) (Figura 6.13). Observou-se uma correlação inversa forte e significativa entre eles (Spearman $r = -0,8051$; $p = 0,0218$).

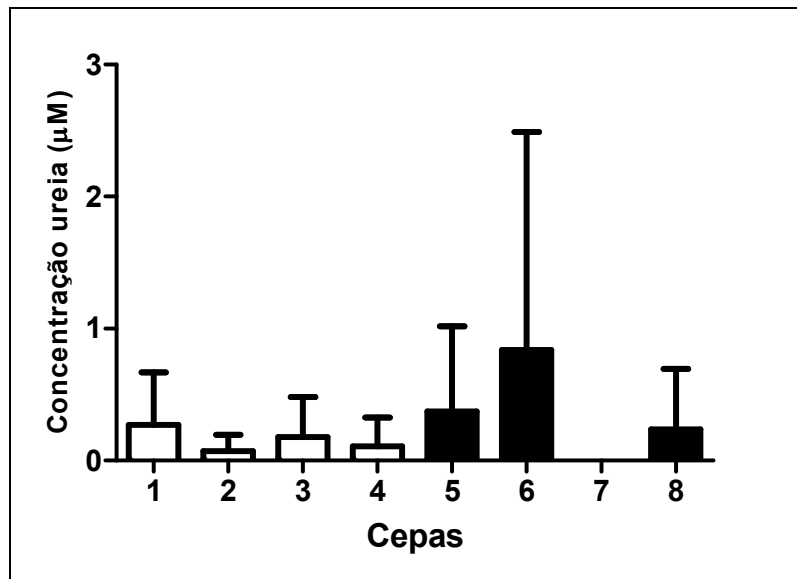


Figura 6.11. Determinação da atividade de arginase das cepas em estudo. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados *in vitro* com cepas de *L. (L.) amazonensis* (barra branca) e de *L. (V.) braziliensis* (barra preta) com taxa de infecção de 5:1 promastigotas em fase estacionária/macrófago. A concentração de ureia foi avaliada após 72h de infecção. Resultados apresentados representam a diferença entre os valores das culturas estimuladas e o da cultura controle não estimulada. Dados representam a média dos resultados de 1-5 experimentos independentes \pm erro padrão. Análise estatística foi realizada utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. 1:MHOM/BR/1977/LTB0016; 2:IFLA/BR/1967/PH8; 3:MHOM/BR/2011/S55; 4:MHOM/BR/2003/NJS; 5:MCAN/BR/1998/R619; 6:MHOM/BR/2000/LTCP13396; 7:MHOM/BR/2002/NMT-RBO005; 8:MHOM/BR/2011/RSG.

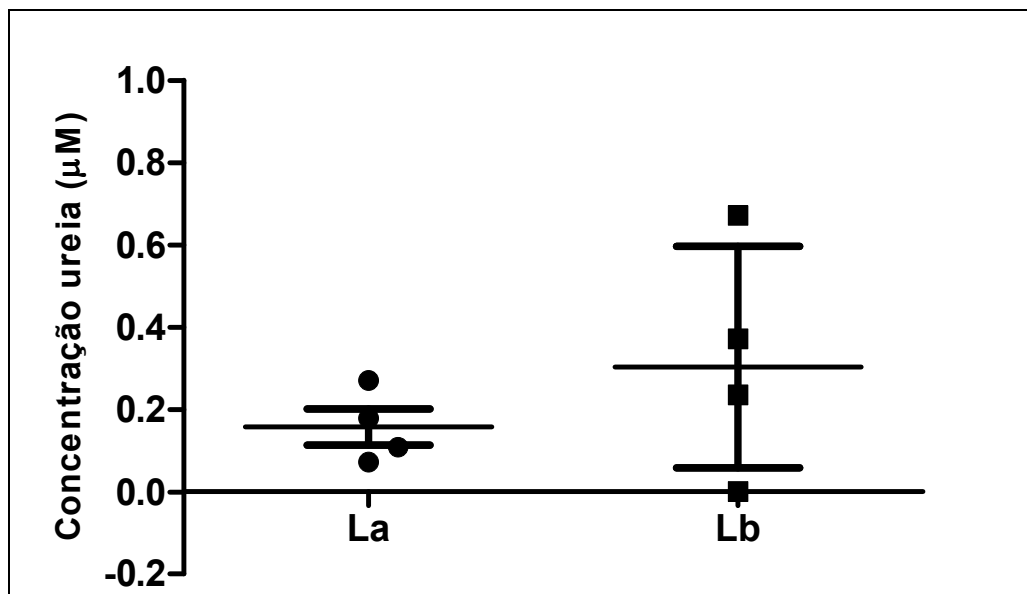


Figura 6.12. Atividade de arginase das espécies em estudo. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados *in vitro* com 4 cepas de *L. (L.) amazonensis* (La) e 4 cepas de *L. (V.) braziliensis* (Lb) com taxa de infecção de 5:1 promastigotas em fase estacionária/macrófago. A ureia foi dosada após 72h de infecção. Resultados apresentados representam a diferença entre os valores das culturas estimuladas e o da cultura controle não estimulada. Cada símbolo representa uma cepa e cada linha representa a mediana do grupo. Dados representam a média dos resultados de 1-5 experimentos independentes. Para análise estatística, o teste não paramétrico de Mann Whitney foi utilizado.

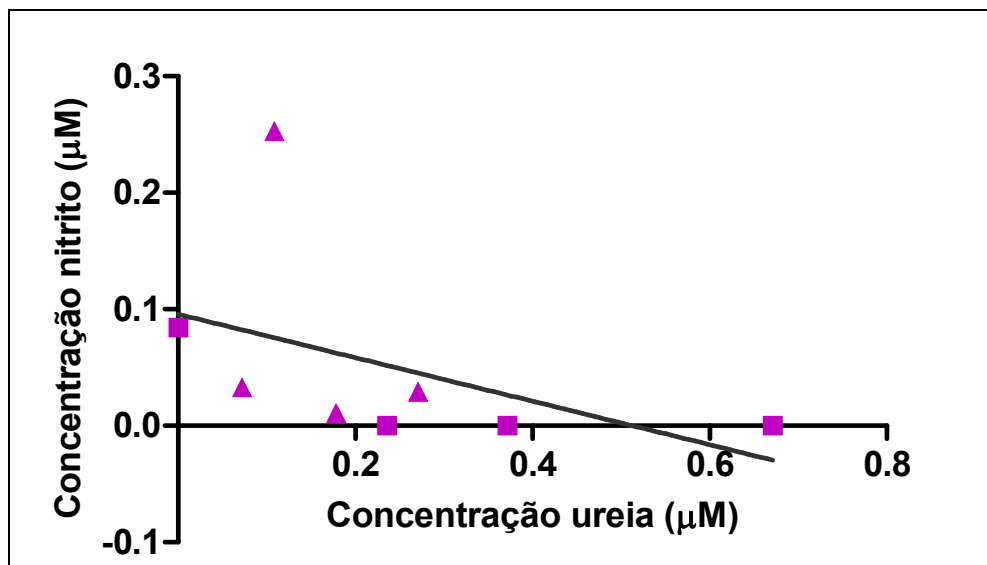


Figura 6.13. Análise de correlação entre nitrito e ureia. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados *in vitro* com cepas de *L. (L.) amazonensis* (▲) e de *L. (V.) braziliensis* (■) com taxa de infecção de 5:1 promastigotas em fase estacionária/macrófago. As concentrações de nitrito e de ureia foram avaliadas 48h e 72h pós-infecção, respectivamente. Resultados apresentados representam a diferença entre os valores das culturas estimuladas e o da cultura controle não estimulada. Cada símbolo representa uma cepa em estudo. Dados representam a média dos resultados de três experimentos independentes. (Spearman $r = -0,8051$; $p = 0,0218$).

6.6 Dosagem de citocinas e quimiocinas em sobrenadantes dos macrófagos infectados por Luminex

Para a realização do Luminex foram coletados sobrenadantes em 12, 24 e 48 horas pós-infecção por cepas de *L. (L.) amazonensis* e de *L. (V.) braziliensis*. No entanto, para a análise de dados, escolheu-se somente o tempo de cultivo que apresentou as maiores médias dos resultados das dosagens, ou seja, 48 horas. Os valores das dosagens estão representados na Figura 6.14. Mais frequentemente, foram observados níveis aparentemente mais altos de citocinas e quimiocinas nas infecções produzidas pelas cepas de *L. (V.) braziliensis* em relação às infecções por *L. (L.) amazonensis*. Não foram observadas diferenças significantes entre as cepas em estudo em todas as citocinas e quimiocinas avaliadas.

Verificaram-se níveis mais elevados de G-CSF e KC nos sobrenadantes de culturas de macrófagos controles não infectados em relação aos macrófagos infectados; no caso de RANTES, o controle apresentou níveis maiores do que macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis*, porém menores que nas infecções por *L. (V.) braziliensis*. Além disso, muitas cepas não induziram a produção de citocinas ou quimiocinas.

O TNF- α foi detectado apenas em culturas das cepas MCAN/BR/1998/R619, MHOM/BR/2000/LTCP13396 e MHOM/BR/2002/NMT-RBO005 de *L. (V.) braziliensis*. Este resultado (assim como os resultados de Luminex referentes a outras citocinas e quimiocinas) foi inesperado. Por esta razão, realizamos um ELISA para verificar os níveis de TNF- α em culturas infectadas pelas cepas em estudo e não infectadas (Figura 6.15).

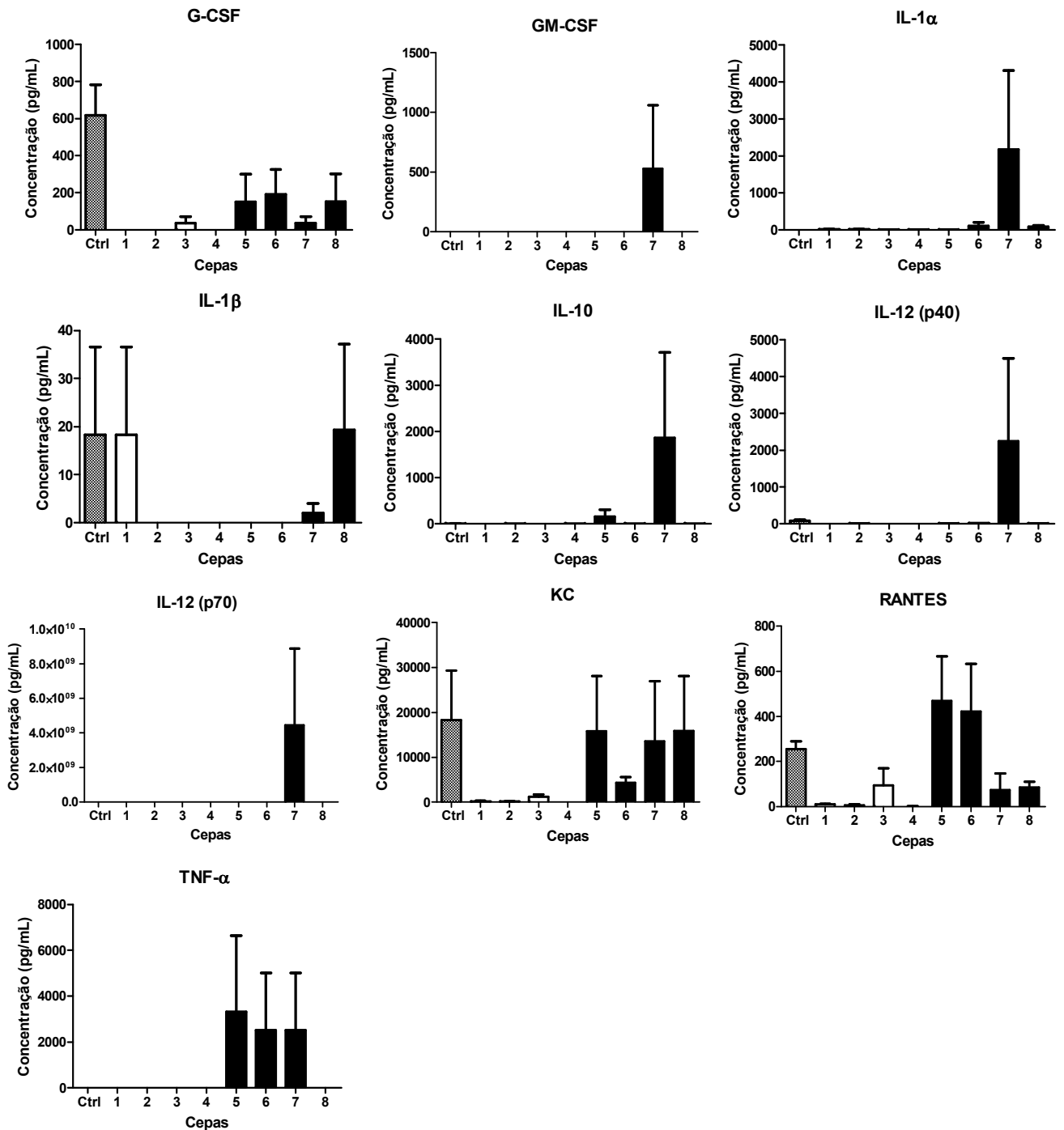


Figura 6.14. Dosagem de citocinas e quimiocinas por Luminex. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados *in vitro* com cepas de *L. (L.) amazonensis* (barra branca) e de *L. (V.) braziliensis* (barra preta) com taxa de infecção de 5:1 promastigotas em fase estacionária/macrófago. Após 48h, os sobrenadantes (em triplicata) foram recolhidos e os níveis de citocinas e quimiocinas foram determinados por Luminex. Dados representam a média das triplicatas ± erro padrão. Para análise estatística, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado. 1:MHOM/BR/1977/LTB0016; 2:IFLA/BR/1967/PH8; 3:MHOM/BR/2011/S55; 4:MHOM/BR/2003/NJS; 5:MCAN/BR/1998/R619; 6:MHOM/BR/2000/LTCP13396; 7:MHOM/BR/2002/NMT-RBO005; 8:MHOM/BR/2011/RSG.

6.7 Dosagem de TNF- α por ELISA

A dosagem do TNF- α foi determinada através do ensaio ELISA em sobrenadantes de culturas de macrófagos murinos infectados com as cepas em estudo em 12 horas pós-infecção.

A análise do ELISA mostra que as células infectadas com a cepa de *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/2011/RSG secretaram maiores níveis de TNF- α (331,82 pg/mL) que o controle (23,07 pg/mL) e os macrófagos infectados pelas demais cepas (variação entre 3,50 pg/mL e 108,78 pg/mL). Não foi observada diferença significativa entre as cepas ou em relação ao controle (Figura 6.15).

Estes resultados se mostraram muito diferentes das dosagens detectadas através do Luminex 12 horas pós-infecção, que detectou TNF- α apenas no sobrenadante das culturas controle de macrófagos não infectados, em níveis elevados e bastante variados entres as triplicatas.

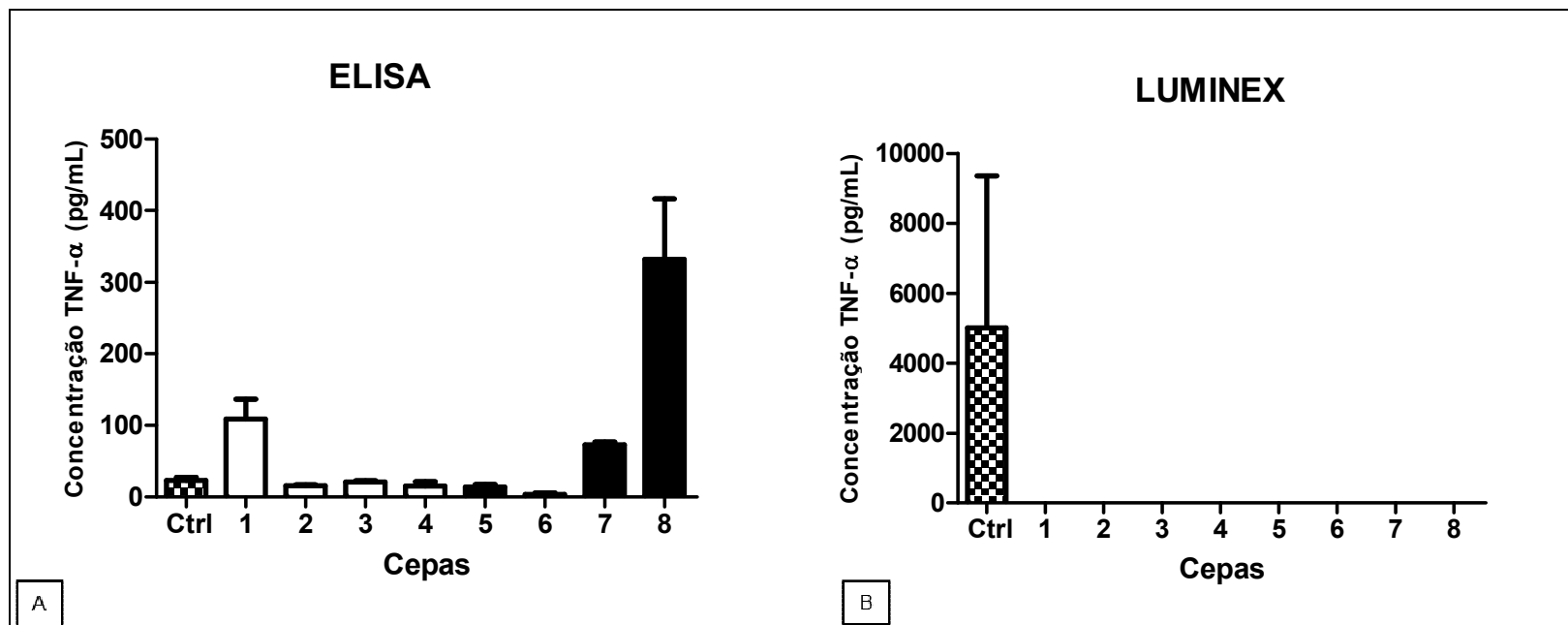


Figura 6.15. Dosagem de TNF- α 12 horas pós-infecção por ELISA (A) e LUMINEX (B). Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados *in vitro* com cepas de *L. (L.) amazonensis* (barra branca) e de *L. (V.) braziliensis* (barra preta) com taxa de infecção de 5:1 promastigotas em fase estacionária/macrófago. Dados do ELISA e do LUMINEX representam a média das triplicatas \pm desvio padrão. Para análise estatística, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado. 1:MHOM/BR/1977/LTB0016; 2:IFLA/BR/1967/PH8; 3:MHOM/BR/2011/S55; 4:MHOM/BR/2003/NJS; 5:MCAN/BR/1998/R619; 6:MHOM/BR/2000/LTCP13396; 7:MHOM/BR/2002/NMT-RBO005; 8:MHOM/BR/2011/RSG.

6.8 PCR Multiplex em tempo real

Os dados foram analisados após serem normalizados. Primeiramente foram investigadas diferenças no perfil de citocinas e quimiocinas das infecções de macrófagos murinos pelas diversas cepas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* em estudo (Figuras 6.16-6.21). Observa-se que não houve diferenças significativas na expressão gênica das citocinas e quimiocinas nos macrófagos infectados pelas diferentes cepas de *Leishmania* sp.

Níveis de significância sugestivos ($p \leq 0,1$) foram observados na expressão dos genes CCL5 ($p= 0,0539$) (Figura 6.16) e G-CSF ($p= 0,063$) (Figura 6.17), quando se comparou a cepa de *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/2002/NMT-RBO005 ao controle. O gene IL-1 α (Figura 6.19), também apresentou nível de significância sugestivo ao se comparar as cepas de *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/2000/LTCP13396 ($p= 0,099$) e MHOM/BR/2002/NMT-RBO005 ($p= 0,072$) às culturas de macrófagos não infectadas.

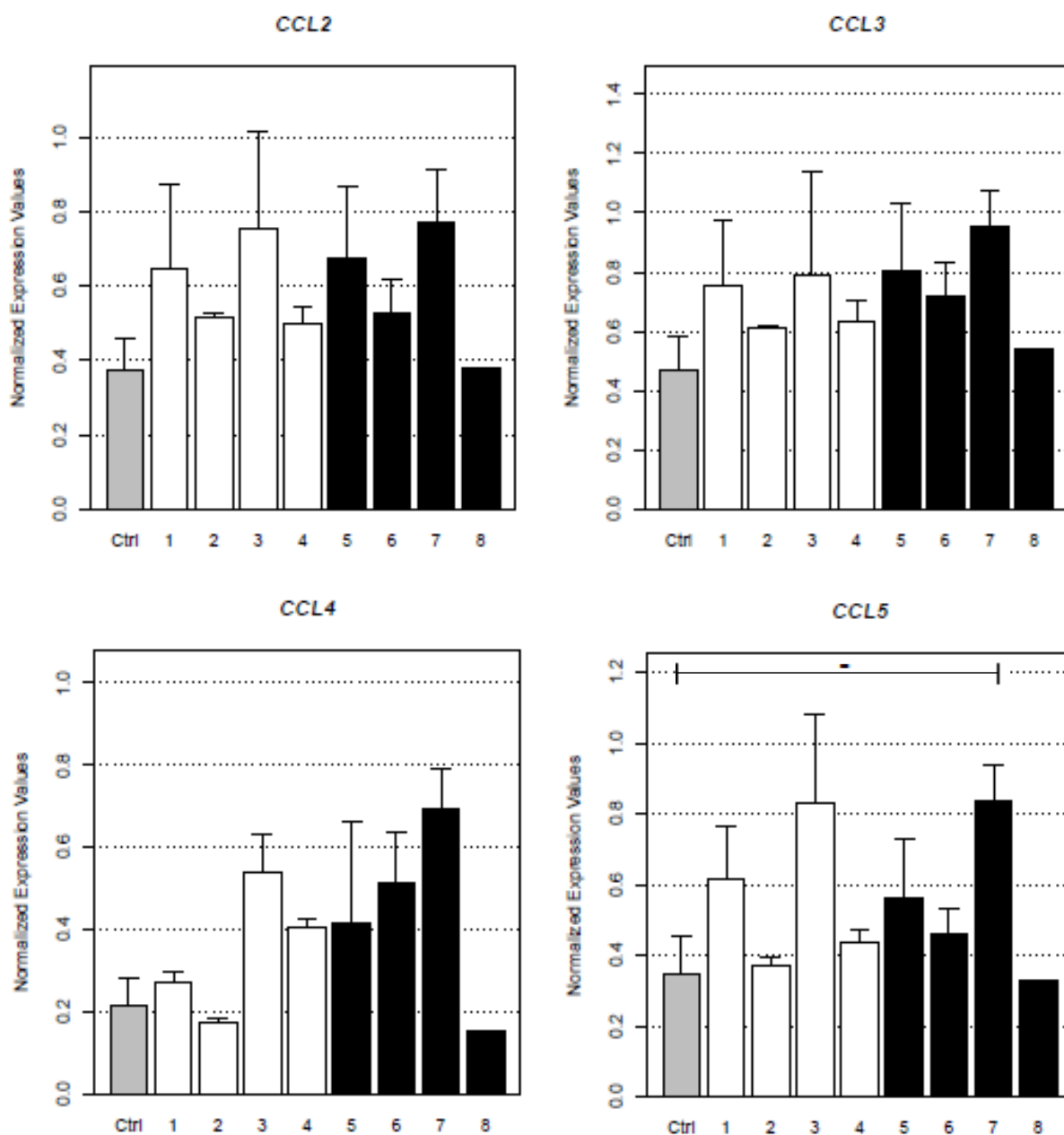


Figura 6.16. Valores normalizados da expressão gênica por PCR Multiplex em tempo real de CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5 em macrófagos murinos infectados por cepas de *L. (L.) amazonensis* (barra branca) e *L. (V.) braziliensis* (barra preta). As barras representam média de 3 experimentos \pm erro padrão da média. Níveis de significância menores ou iguais 0,1 (*) foram considerados como sugestivos. 1:MHOM/BR/1977/LTB0016; 2:IFLA/BR/1967/PH8; 3:MHOM/BR/2011/S55; 4:MHOM/BR/2003/NJS; 5:MCAN/BR/1998/R619; 6:MHOM/BR/2000/LTCP13396; 7:MHOM/BR/2002/NMT-RBO005; 8:MHOM/BR/2011/RSG.

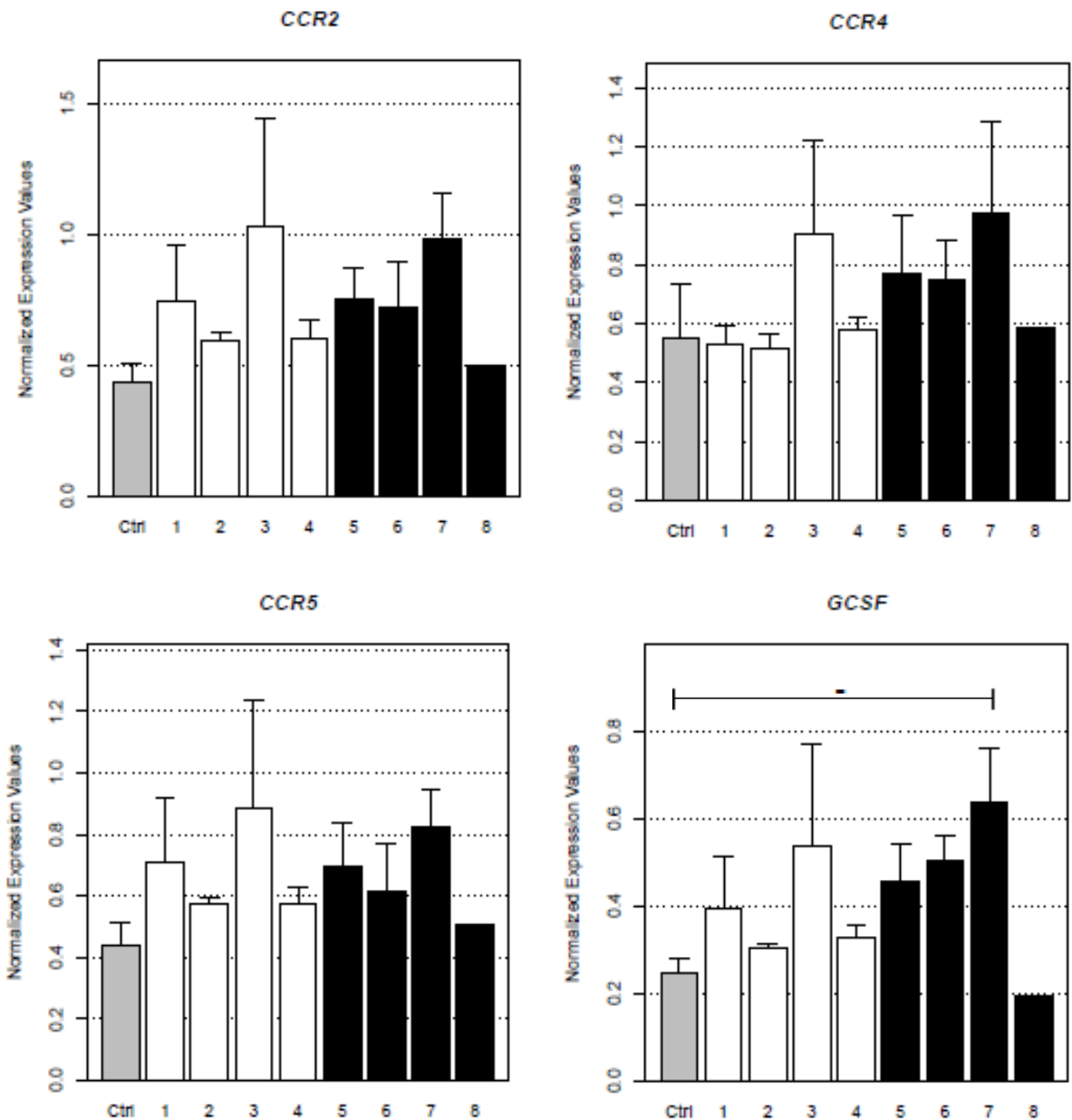


Figura 6.17. Valores normalizados da expressão gênica por PCR Multiplex em tempo real de CCR2, CCR4, CCR5 e G-CSF em macrófagos murinos infectados por cepas de *L. (L.) amazonensis* (barra branca) e *L. (V.) braziliensis* (barra preta). As barras representam média de 3 experimentos \pm erro padrão da média. Níveis de significância menores ou iguais 0,1 (*) foram considerados como sugestivos. 1:MHOM/BR/1977/LTB0016; 2:IFLA/BR/1967/PH8; 3:MHOM/BR/2011/S55; 4:MHOM/BR/2003/NJS; 5:MCAN/BR/1998/R619; 6:MHOM/BR/2000/LTCP13396; 7:MHOM/BR/2002/NMT-RBO005; 8:MHOM/BR/2011/RSG.

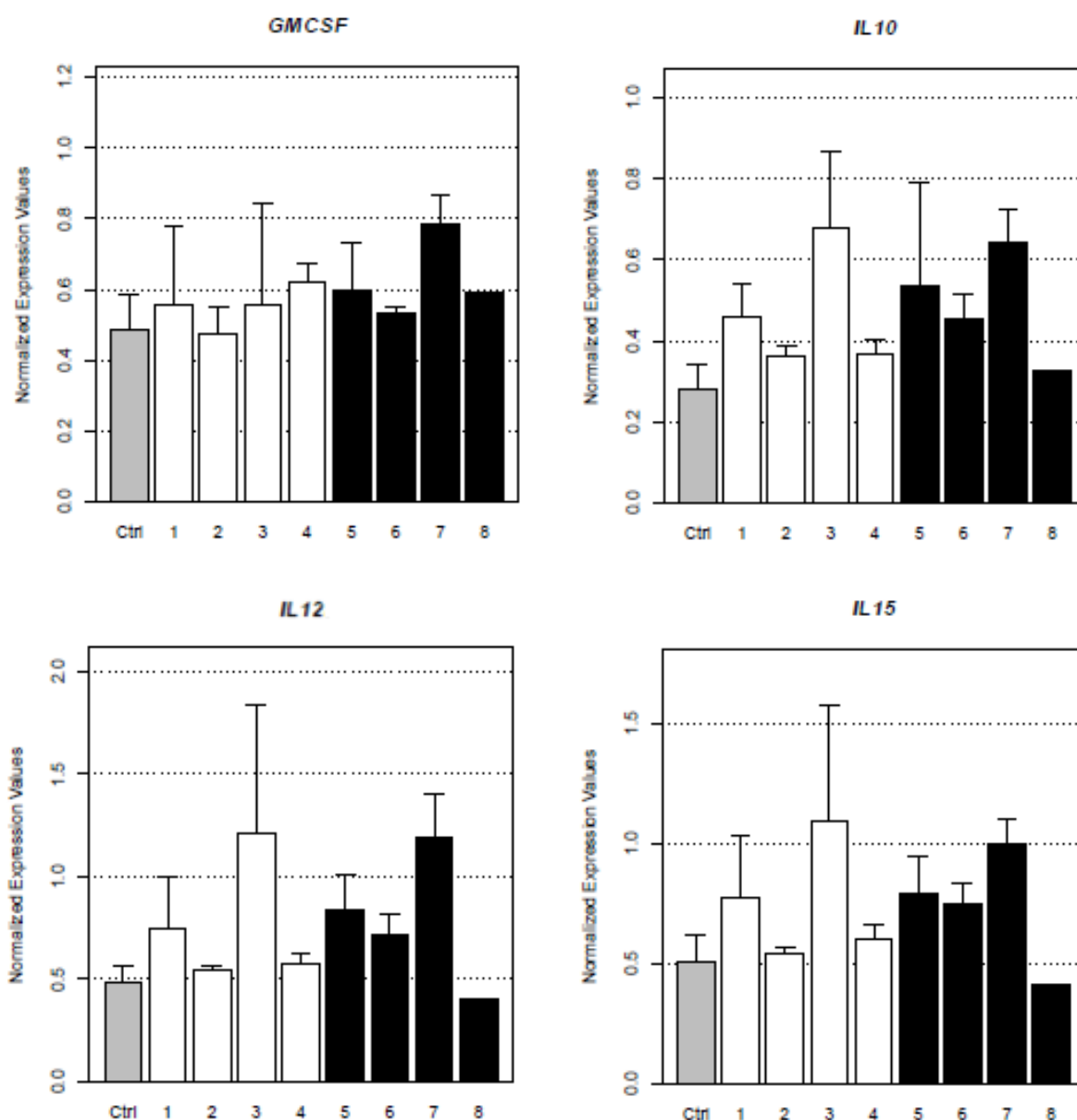


Figura 6.18. Valores normalizados da expressão gênica por PCR Multiplex em tempo real de GM-CSF, IL-10, IL-12 e IL-15 em macrófagos murinos infectados por cepas de *L. (L.) amazonensis* (barra branca) e *L. (V.) braziliensis* (barra preta). As barras representam média de 3 experimentos \pm erro padrão da média. Níveis de significância menores ou iguais 0,1 () foram considerados como sugestivos. 1:MHOM/BR/1977/LTB0016; 2:IFLA/BR/1967/PH8; 3:MHOM/BR/2011/S55; 4:MHOM/BR/2003/NJS; 5:MCAN/BR/1998/R619; 6:MHOM/BR/2000/LTCP13396; 7:MHOM/BR/2002/NMT-RBO005; 8:MHOM/BR/2011/RSG.

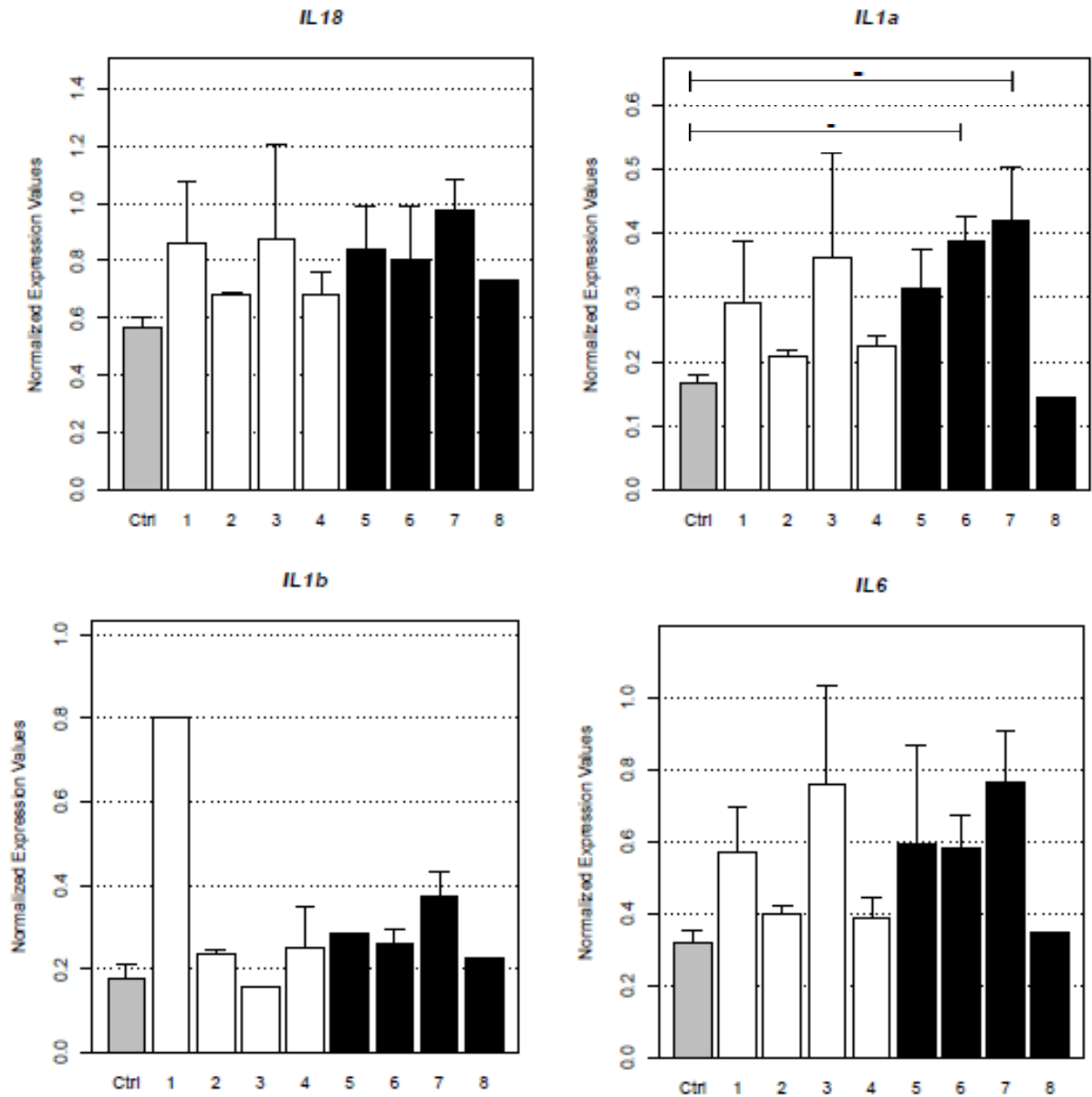


Figura 6.19. Valores normalizados da expressão gênica por PCR Multiplex em tempo real de IL-18, IL-1 α , IL-1 β e IL-6 em macrófagos murinos infectados por cepas de *L. (L.) amazonensis* (barra branca) e *L. (V.) braziliensis* (barra preta). As barras representam média de 3 experimentos \pm erro padrão da média. Níveis de significância menores ou iguais 0,1 (*) foram considerados como sugestivos. 1:MHOM/BR/1977/LTB0016; 2:IFLA/BR/1967/PH8; 3:MHOM/BR/2011/S55; 4:MHOM/BR/2003/NJS; 5:MCAN/BR/1998/R619; 6:MHOM/BR/2000/LTCP13396; 7:MHOM/BR/2002/NMT-RBO005; 8:MHOM/BR/2011/RSG.

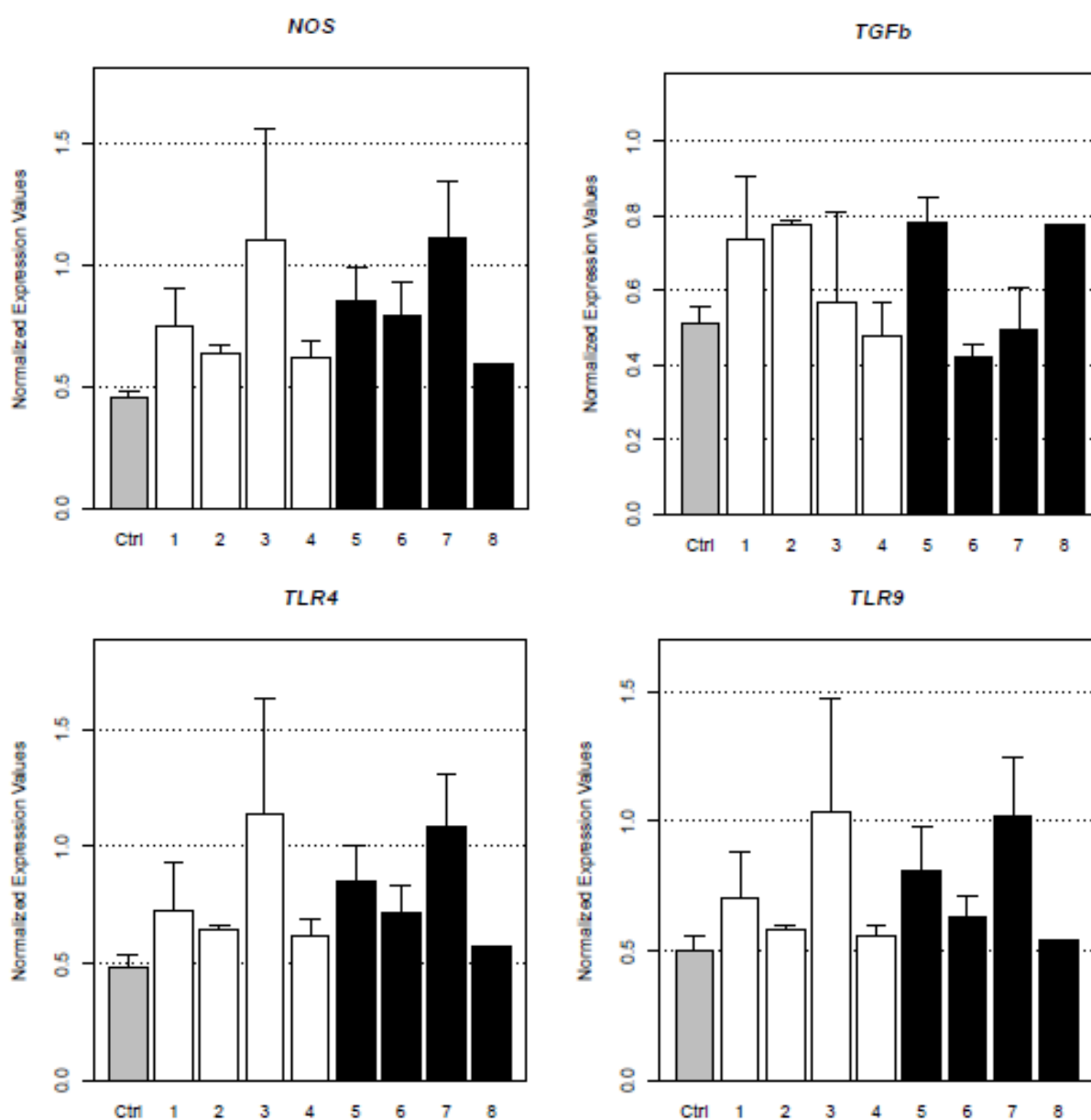


Figura 6.20. Valores normalizados da expressão gênica por PCR Multiplex em tempo real de NOS, TGF- β , TLR4 e TLR9 em macrófagos murinos infectados por cepas de *L. (L.) amazonensis* (barra branca) e *L. (V.) braziliensis* (barra preta). As barras representam média de 3 experimentos \pm erro padrão da média. Níveis de significância menores ou iguais 0,1 (·) foram considerados como sugestivos. 1:MHOM/BR/1977/LTB0016; 2:IFLA/BR/1967/PH8; 3:MHOM/BR/2011/S55; 4:MHOM/BR/2003/NJS; 5:MCAN/BR/1998/R619; 6:MHOM/BR/2000/LTCP13396; 7:MHOM/BR/2002/NMT-RBO005; 8:MHOM/BR/2011/RSG.

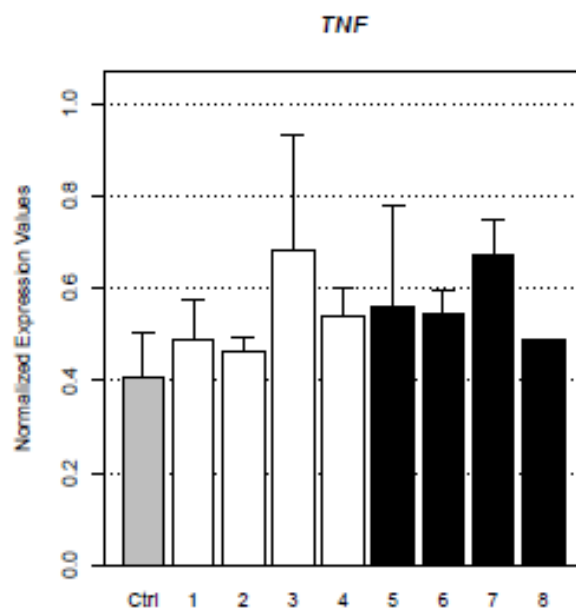


Figura 6.21. Valores normalizados da expressão gênica por PCR Multiplex em tempo real de TNF- α em macrófagos murinos infectados por cepas de *L. (L.) amazonensis* (barra branca) e *L. (V.) braziliensis* (barra preta). As barras representam média de 3 experimentos \pm erro padrão da média. Níveis de significância menores ou iguais 0,1 (°) foram considerados como sugestivos. 1:MHOM/BR/1977/LTB0016; 2:IFLA/BR/1967/PH8; 3:MHOM/BR/2011/S55; 4:MHOM/BR/2003/NJS; 5:MCAN/BR/1998/R619; 6:MHOM/BR/2000/LTCP13396; 7:MHOM/BR/2002/NMT-RBO005; 8:MHOM/BR/2011/RSG.

Após essa primeira análise, foi feita a comparação dos grupos de infecção com *L. (L.) amazonensis* e com *L. (V.) braziliensis* entre si e com o controle (macrófagos não infectados), representado nas Figuras 6.22-6.24. A expressão das citocinas G-CSF, IL-1 α (Figura 6.23), IL-6 e da NOS (óxido nítrico sintase) (Figura 6.24) nas culturas estimuladas por *L. (V.) braziliensis* foi significativamente maior do que o controle (p= 0,0329; 0,021; 0,045; 0,0329; respectivamente). Já a expressão da quimiocina CCL3, dos receptores de quimiocinas CCR2 e CCR5 (Figura 6.22) e da citocina IL-10 (Figura 6.23) nas culturas estimuladas por *L. (V.) braziliensis* foi maior do que o controle em um nível de significância sugestivo (p= 0,063; 0,072; 0,084; 0,093; respectivamente).

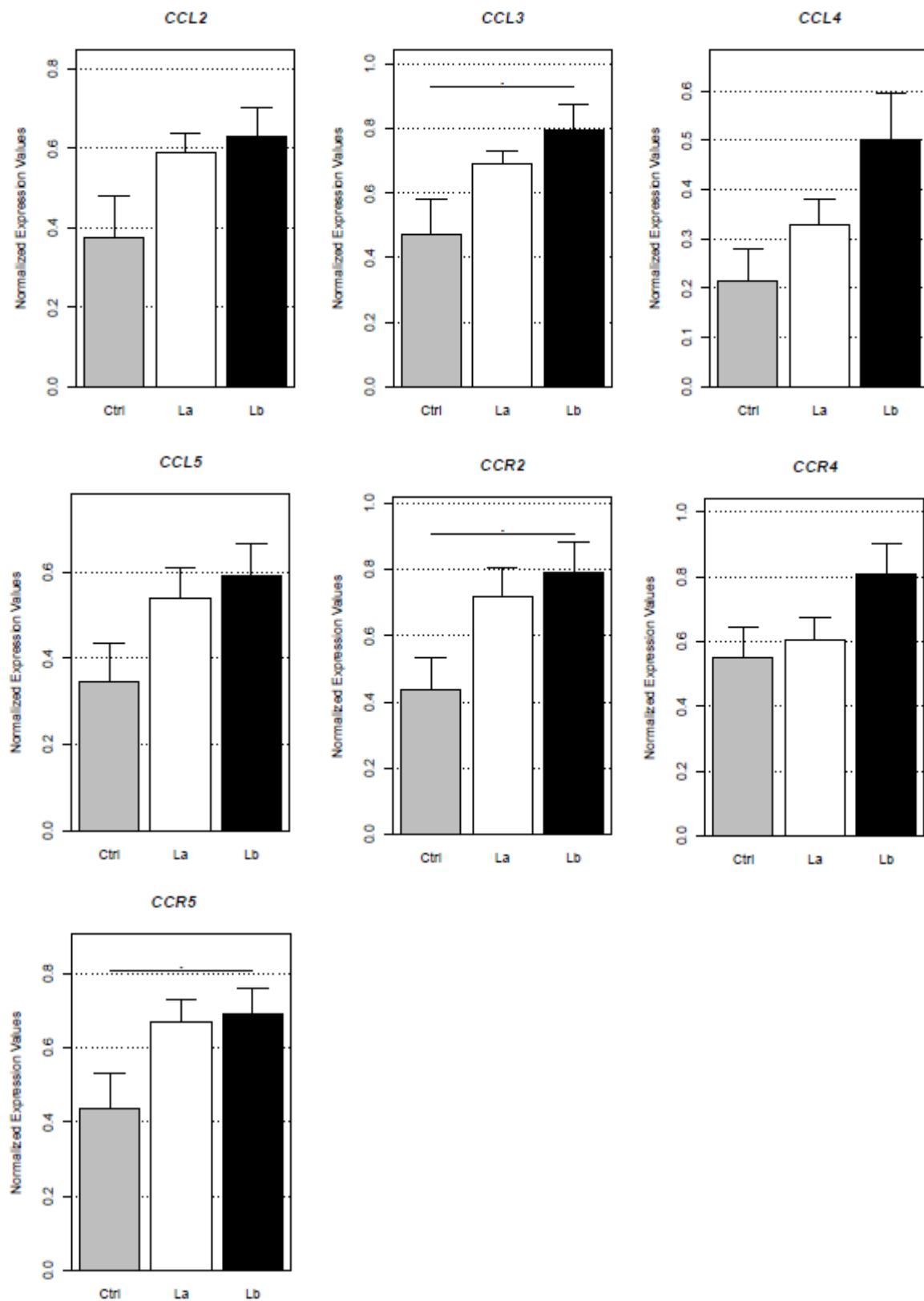


Figura 6.22. Valores normalizados da expressão gênica por PCR Multiplex em tempo real de CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCR2, CCR4 e CCR5 em macrófagos murinos infectados por cepas de *L. (L.) amazonensis* (La, barra branca) e *L. (V.) braziliensis* (Lb, barra preta). As barras representam média \pm erro padrão das amostras biológicas pertencente a cada grupo. Níveis de significância inferiores ou iguais a 0,05 (*) e 0,1 (·) foram considerados como significante e sugestivo, respectivamente.

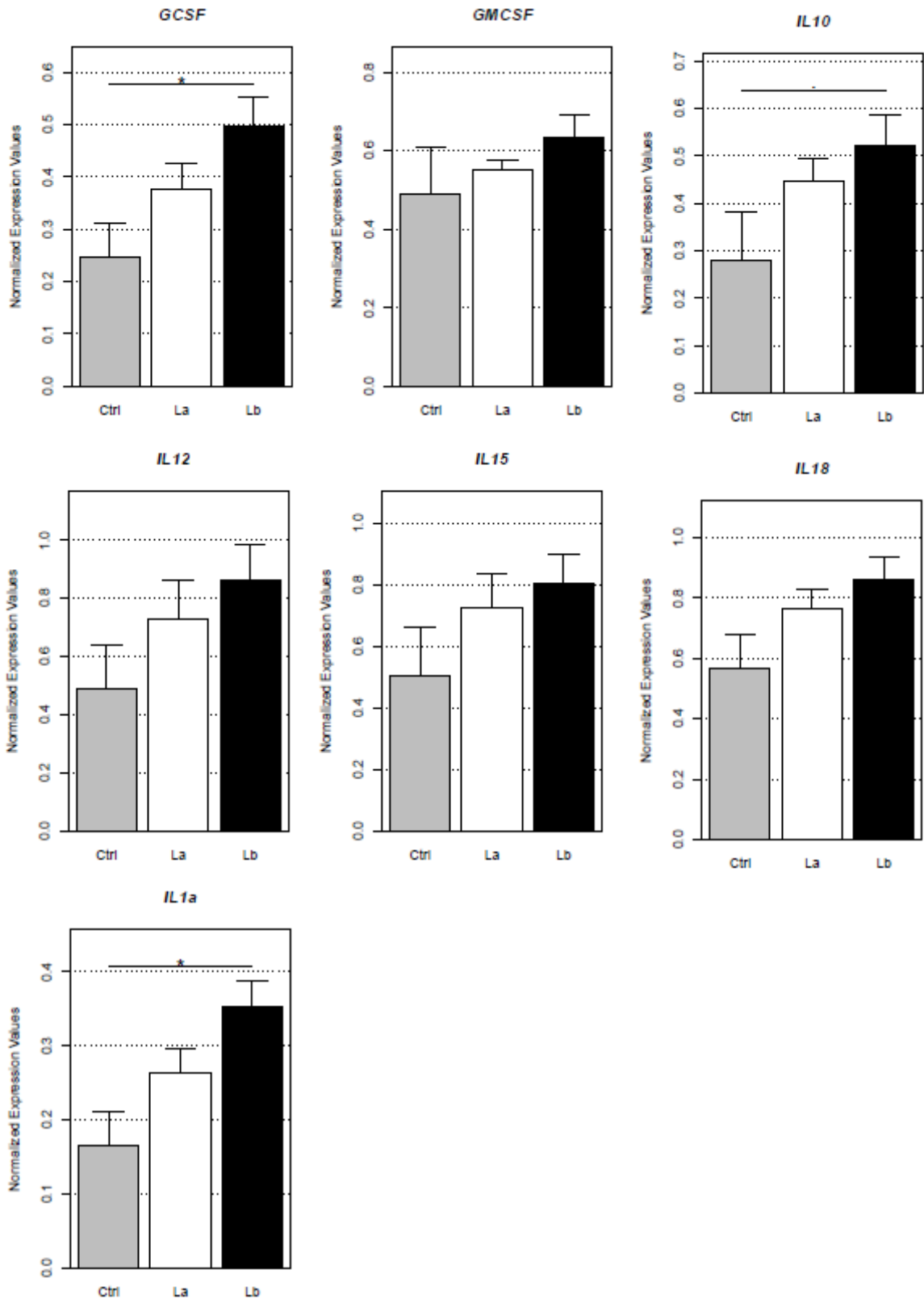


Figura 6.23. Valores normalizados da expressão gênica por PCR Multiplex em tempo real de G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-1 α em macrófagos murinos infectados por cepas de *L. (L.) amazonensis* (La, barra branca) e *L. (V.) braziliensis* (Lb, barra preta). As barras representam média \pm erro padrão das amostras biológicas pertencente a cada grupo. Níveis de significância inferiores ou iguais a 0,05 (*) e 0,1 (°) foram considerados como significante e sugestivo, respectivamente.

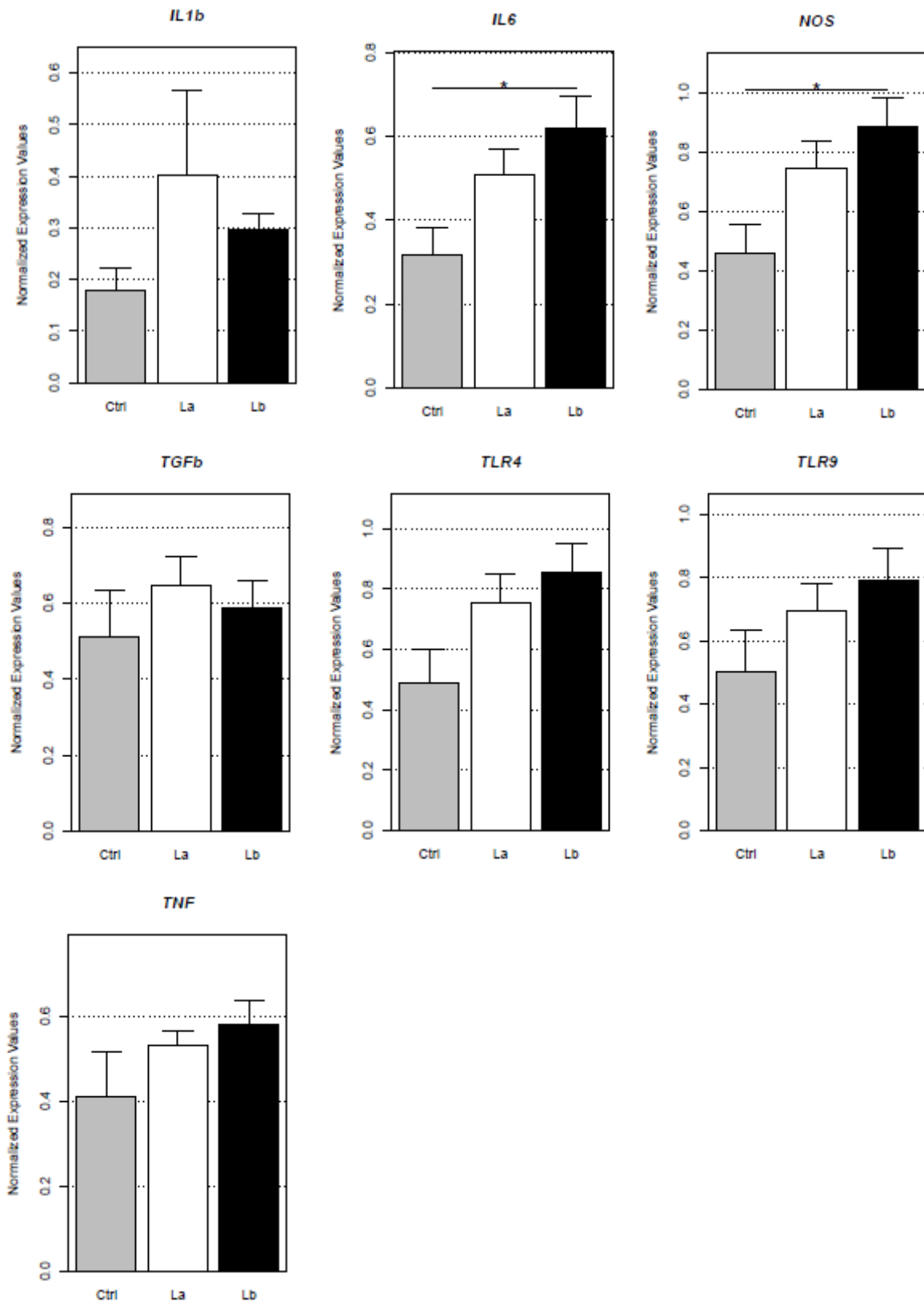


Figura 6.24. Valores normalizados da expressão gênica por PCR Multiplex em tempo real de IL-1 β , IL-6, NOS, TGF- β , TRL4, TLR9 e TNF- α em macrófagos murinos infectados por cepas de *L. (L.) amazonensis* (La, barra branca) e *L. (V.) braziliensis* (Lb, barra preta). As barras representam média \pm erro padrão das amostras biológicas pertencente a cada grupo. Níveis de significância inferiores ou iguais a 0,05 (*) e 0,1 (·) foram considerados como significante e sugestivo, respectivamente.

7. DISCUSSÃO

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que podem ser causadas por várias espécies do gênero *Leishmania*. No Brasil, a espécie *Leishmania (V.) braziliensis* é o agente etiológico predominante na região nordeste do país, enquanto *Leishmania (L.) amazonensis* é a espécie mais amplamente bem distribuída (de Araújo *et al.*, 2014). Apesar das duas espécies serem causadoras da leishmaniose tegumentar americana (LTA) (Camara *et al.*, 2011), causam infecção com características imunopatogênicas contrastantes. A *L. (L.) amazonensis* atua inibindo a resposta pró-inflamatória anti-*Leishmania*, conduzindo a infecção para o pólo anérgico do espectro imunopatológico, representado pela leishmaniose cutânea difusa e uma resposta imune marcante do tipo 2 ou reguladora (Silveira *et al.*, 2009). Enquanto a *L. (V.) braziliensis* cursa na presença de uma resposta imune anti-*Leishmania* do tipo 1, direcionando a infecção para o pólo hiperérgico, representado pela leishmaniose mucosa e caracterizado por uma resposta proeminente do tipo 1, pró-inflamatória (Silveira *et al.*, 2009).

Considerando que as diferentes espécies de *Leishmania* causam patologias distintas por mecanismos ainda desconhecidos em sua totalidade, o presente estudo pretendeu caracterizar as diferenças no perfil de citocinas e quimiocinas e de infectividade/virulência produzidas na resposta imune inata de macrófagos murinos infectados *in vitro* por duas espécies causadoras de LTA no Brasil, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Além disso, buscou-se melhorar a compreensão acerca das complexidades e particularidades das interações parasito-macróforo relacionadas às duas espécies em estudo, assim como de variações entre diferentes cepas pertencentes à mesma espécie.

Camundongos BALB/c são parcialmente resistentes a infecção com *L. (V.) braziliensis*, desenvolvendo lesões não ulceradas que evoluem para cura espontânea com resposta imune celular mista (Souza *et al.*, 2000; de Araújo *et al.*, 2014), enquanto que o modelo de infecção de hamster (*Mesocricetus auratus*) se apresenta altamente susceptível a infecção pelas espécies dermatrópicas de *Leishmania* sp., desenvolvendo lesões cutâneas quando inoculados com espécies do subgênero *Viannia* ou *Leishmania* (Gomes-Silva *et al.*, 2013). Além disso, como dito anteriormente, cinco das oito cepas utilizadas no estudo foram cedidas pela CLIOC e esta não possui controle sobre o número de passagens *in vitro* das cepas,

não havendo, portanto manutenção da virulência. De acordo com Lei, Romine e Beetham (2010) repetidas séries de passagens *in vitro* modificam o desenvolvimento das promastigotas, alterando, por exemplo, as propriedades de virulência e diminuindo a proporção de promastigotas metacíclicas. Desse modo, antes do início dos ensaios de infecção de macrófagos murinos foi necessário fazer uma passagem das cepas em hamsters, na tentativa de garantir o sucesso do isolamento e homogeneização da virulência das cepas em estudo.

Um dos aspectos analisados neste trabalho foi o desenvolvimento de lesões cutâneas pelos hamsters infectados pelas cepas em estudo (Tabela 6.1). Em média, as diferentes cepas levaram cerca de 4 meses para gerar lesões ulceradas nos hamsters. O mesmo período foi observado por Gomes-Silva *et al.* (2013). Estudos apontam o modelo de infecção em hamster como um ótimo modelo animal para o estudo da leishmaniose causada por espécies do subgênero *Viannia* devido ao fato de serem susceptíveis a estes parasitas e também pela semelhança aos sintomas clínicos apresentados em humanos, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento de lesões ulceradas crônicas (Osorio *et al.*, 1998; Gómez-Galindo e Delgado-Murcia, 2013). Entretanto, neste estudo, apenas três dentre seis cepas de *L. (V.) braziliensis* geraram lesões cutâneas (50%), enquanto todas as cepas de *L. (L.) amazonensis* as produziram, de modo que as cepas da segunda espécie, representantes do subgênero *Leishmania* se mostraram mais virulentas que as cepas da primeira, pertencentes ao subgênero *Viannia*. No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa.

A observação da curva de crescimento se fez necessária, pois permitiu acompanhar o processo de metaciclogênese, determinando as fases exponencial e estacionária de crescimento da *Leishmania* no sistema de cultivo utilizado (Cysne-Finkelstein *et al.*, 1998). Além disso, a determinação da fase estacionária, na qual predominam as promastigotas metacíclicas, era necessária, visto que esta fase possui maior potencial infectante do que o estágio de promastigotas procíclicas ou crescimento logarítmico, permitindo a infecção das células pelas cepas em estudo (Sacks e Perkins, 1984). Apesar de Sacks e Perkins (1984) terem descrito os estágios de desenvolvimento das promastigotas durante a metaciclogênese há cerca de 30 anos, os fatores que desencadeiam este processo, geralmente associados a “condições de estresse”, continuam mal compreendidos.

A análise da curva de crescimento das cepas *in vitro* (Figura 6.1) mostrou similaridade no curso temporal do crescimento das cepas de *L. (L.) amazonensis*, que atingiram a fase estacionária no 3º dia de cultivo. O perfil de crescimento das cepas de *L. (V.) braziliensis* apresentou pequena variação, pois uma das cepas, MHOM/BR/2011/RSG, atingiu a fase estacionária no 3º dia e não no 4º dia como as demais cepas do subgênero *Viannia*. Embora não tenha sido observada diferença estatística entre as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* quanto ao dia de alcance da fase estacionária, os resultados indicam que elas diferem quanto ao tempo de replicação celular em cultivo *in vitro*, com *L. (L.) amazonensis* se multiplicando mais rapidamente que *L. (V.) braziliensis* em meio Schneider. Estes resultados corroboram os de Da Silva (2008) que, ao determinar curvas de crescimento das mesmas espécies também em meio Schneider, encontrou um período menor para atingir a fase estacionária nas culturas de *L. (L.) amazonensis* quando comparadas às de *L. (V.) braziliensis* (6º e 8º dia, respectivamente).

As imagens de microscopia óptica dos macrófagos infectados com as cepas em estudo mostram claras diferenças entre as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* (Figura 6.3). Os macrófagos infectados com cepas de *L. (L.) amazonensis* possuem vacúolos parasitóforos grandes e bem visíveis, contendo grande número de formas amastigotas (variando de dezenas a milhares), enquanto células infectadas por *L. (V.) braziliensis* possuem vacúolos parasitóforos menores, por vezes de difícil visualização, contendo escasso número de parasitas intracelulares. Estes achados são compatíveis com os achados na literatura para infecção de macrófagos de acordo com Moraes e Silveira (1994), Chang *et al.* (2003), Silveira *et al.* (2004), Ministério da Saúde (2007) e Zauli-Nascimento *et al.* (2009). Segundo Ramazeilles *et al.* (1990) e Chang *et al.* (2003), vacúolos parasitóforos grandes na infecção por *L. (L.) amazonensis* estão relacionados *in vivo* e *in vitro* à presença de parasitos vivos virulentos, visto que estes vacúolos não são observados em infecções com parasitos mortos, cepas não virulentas ou desaparecem após tratamento leishmanicida. É importante enfatizar que a cepa IFLA/BR/1967/PH8 não se encaixou no perfil de infecção da sua espécie, pois ao contrário das demais cepas de *L. (L.) amazonensis*, induziu a formação de vacúolos parasitóforos pequenos e com poucos parasitos.

No modelo de infecção *in vitro* utilizado neste trabalho, verificou-se que as duas espécies em estudo, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, foram capazes

de estabelecer infecção e de proliferar no interior de macrófagos murinos no tempo analisado. Quanto à determinação da porcentagem de infecção de macrófagos e da carga parasitária intracelular, verificou-se que não houve diferença estatística entre as espécies (Figuras 6.5 e 6.7). Na comparação entre todas as cepas (Figuras 6.4 e 6.6), constatou-se uma maior variabilidade intraespecífica em *L. (L.) amazonensis* em comparação com *L. (V.) braziliensis*. Apenas uma diferença estatisticamente significativa foi observada entre as cepas no que se refere à porcentagem de células infectadas, que foi significativamente maior ($p = 0,01$) na cepa MHOM/BR/2011/NJS em comparação à IFLA/BR/1967/PH8, ambas *L. (L.) amazonensis*.

Assim como foi observado na microscopia, a cepa de IFLA/BR/1967/PH8 apresentou baixa infectividade em relação às demais cepas de *L. (L.) amazonensis*, tendo sido observado baixa porcentagem de macrófagos infectados e número reduzido de amastigotas intracelulares.

Como referido anteriormente, as cepas de *L. (L.) amazonensis* MHOM/BR/1977/LTB0016 e IFLA/BR/1967/PH8, não foram obtidas da CLIOC como as demais cepas de *L. (L.) amazonensis*. Estas duas cepas vêm sendo cultivadas em nosso laboratório há vários anos. São realizadas passagens periódicas em camundongos visando a manutenção da infectividade destas cepas. Em estudos anteriores realizados com as cepas MHOM/BR/1977/LTB0016 (Bertho *et al.*, 1992; Matta *et al.*, 2010; Lacerda *et al.*, 2012) e IFLA/BR/1967/PH8 (dados não publicados) foram observados elevados percentuais de infecção de macrófagos e números de amastigotas/100 células. Embora as duas cepas tenham sido utilizadas no presente trabalho sob as mesmas condições experimentais, ou seja, após passagem em hamster, apenas a cepa IFLA/BR/1967/PH8 apresentou uma virulência menor do que a esperada, com percentual de infecção de macrófagos e número de amastigotas intracelulares muito abaixo dos níveis que normalmente observamos com esta cepa. Por outro lado, a cepa MHOM/BR/1977/LTB0016 não mostrou uma infectividade reduzida como a observada na cepa IFLA/BR/1967/PH8.

A aparente mudança de comportamento da cepa IFLA/BR/1967/PH8 após a passagem em hamster foi investigada através da comparação de macrófagos murinos infectados com amostras desta cepa isoladas de camundongo BALB/c e de hamster (Figura 6.8). Os resultados obtidos indicam que a origem do isolamento da cepa pode ter influenciado essa mudança de comportamento, visto que foi observada aparente diferença de infectividade entre os isolados. A virulência da

cepa isolada de camundongo (percentual de infecção $62,33\% \pm 5,51$; número de amastigotas/100 células $156,7 \pm 39,32$) foi aparentemente mais elevada que a virulência da cepa isolada de hamster (percentual de infecção $14,67\% \pm 8,51$; número de amastigotas/100 células $26,33 \pm 18,56$). Desse modo, notamos que a passagem da cepa IFLA/BR/1967/PH8 de *L. (L.) amazonensis* em diferentes hospedeiros vertebrados, primeiramente em camundongo BALB/c e posteriormente em hamster, pode ter influenciado a mudança de comportamento relativo à virulência aqui observada. Não foram encontrados relatos semelhantes na literatura.

Neste estudo, a produção de óxido nítrico e a atividade de arginase foram avaliadas em macrófagos murinos infectados *in vitro* pelas cepas em estudo. Na literatura são descritas diferenças sobre a indução da produção de NO para diferentes espécies, enquanto *L. (V.) braziliensis* induz a produção de NO (de Bastos, 2008), *L. (L.) amazonensis* a inibe (Balestieri *et al.*, 2002). Neste trabalho, também se observou uma aparente diferença entre as espécies (Figura 6.10), porém contrariando o descrito na literatura, já que todas as cepas de *L. (L.) amazonensis* e somente a cepa MHOM/BR/2002/NMT-RBO005 de *L. (V.) braziliensis* induziram a produção de NO. As concentrações de nitrito determinadas neste trabalho foram muito baixas, variando entre 0-0,25 μM , em contraste com os níveis mais altos encontrados por Genestra *et al.* (2006), Soares-Bezerra *et al.* (2008) e Lacerda *et al.* (2012), entre 6-8 μM , aproximadamente 4 μM , entre 40-50 μM , respectivamente, em infecções com a cepa MHOM/BR/1977/LTB0016 de *L. (L.) amazonensis*. Amorim *et al.* (2012) também encontraram nível elevado, cerca de 5 μM , em infecção com isolados de *L. (V.) braziliensis*.

Em relação a produção de ureia (Figura 6.11), observou-se que a atividade de arginase nas culturas infectadas por *L. (V.) braziliensis* foi mais heterogênea do que nas infectadas por *L. (L.) amazonensis*. Além disso, evidenciou-se que todas as cepas, com exceção da cepa MHOM/BR/2002/NMT-RBO005 de *L. (V.) braziliensis*, induziram a atividade de arginase. Dentre todas as cepas de *L. (V.) braziliensis*, a cepa MHOM/BR/2002/NMT-RBO005 foi a única cepa que induziu a produção de NO e não que induziu a atividade de arginase. Também pôde ser evidenciado que dentre as cepas de *L. (V.) braziliensis*, esta cepa apresentou o menor percentual de infecção de macrófagos e número de amastigotas por 100 células, o que pode ter sido influenciado pela ausência de atividade de arginase. Assim como a produção de nitrito, a produção de ureia também foi baixa, variando entre 0-0,67 μM . Estes dados

corroboram os dados de Soares-Bezerra *et al.* (2008), que também determinaram baixo nível de ureia, aproximadamente 1 μ M. Lacerda *et al.* (2012) determinaram níveis mais elevados, entre 2-3 μ g/mL. Em ambos os estudos citados, as infecções experimentais foram realizadas com a cepa MHOM/BR/1977/LTB0016 de *L. (L.) amazonensis*.

Como dito anteriormente, a produção de óxido nítrico e atividade de arginase por macrófagos murinos infectados é dependente a disponibilidade de L-arginina, seja para a enzima iNOS ou para a arginase (Inieta, Gomez-Nieto e Corraliza, 2001; Balestieri *et al.*, 2002), de modo que as enzimas competem entre si direta ou indiretamente. Nossos resultados corroboram esta afirmação, pois se notou uma correlação inversa forte e significativa entre NO e arginase (Figura 6.13).

Citocinas e quimiocinas participam da resposta inflamatória durante a infecção por *Leishmania*. Neste estudo, comparou-se o perfil de citocinas e quimiocinas produzidos por macrófagos infectados *in vitro* pelas cepas em estudo. Na dosagem realizada através do Luminex (Figura 6.14), verificaram-se níveis aparentemente mais altos de citocinas e quimiocinas nas infecções produzidas pelas cepas de *L. (V.) braziliensis* em relação às infecções por *L. (L.) amazonensis*. Perfil semelhante foi observado na abordagem realizada através do PCR Multiplex em tempo real. Não houve diferença estatística significativa entre as cepas ou entre as espécies quanto aos níveis de qualquer citocina ou quimiocina estudada.

Como os resultados obtidos através da metodologia do Luminex foram inesperados, foi realizado um ELISA para comparar os resultados de TNF- α em sobrenadantes de 12h de culturas infectadas e não infectadas pelas cepas em estudo estimados por Luminex e ELISA (Figura 6.15). O TNF- α é secretado por macrófagos e linfócitos e está envolvido com resposta imune Th1. Na infecção por *Leishmania* atua em sinergia com o INF- γ na ativação de macrófagos, contribuindo para o controle da infecção (Alexander e Bryson, 2005). Na infecção por *L. (V.) braziliensis* predomina a resposta Th1, com produção exagerada de IFN- γ e TNF- α , citocinas envolvidas na ativação de macrófagos e eliminação dos parasitas (Silveira, Lainson e Corbett, 2004; Carvalho *et al.*, 2013). Diferentemente do Luminex, no qual somente culturas não infectadas induziram a secreção de TNF- α , no ELISA todas as cepas induziram a produção desta citocina, com níveis aparentemente maiores em infecções por *L. (V.) braziliensis*. Estes dados corroboram os dados obtidos por Côrtes (2008), que mostraram baixos níveis de TNF- α em lesões causadas por *L.*

(*L.*) *amazonensis* em camundongos e por Leopoldo *et al.* (2006), que observaram produção *in vitro* de TNF- α por células mononucleares do sangue periférico de pacientes após estímulo com antígeno de *L. (V.) braziliensis*.

Para a realização da caracterização do perfil de citocinas e quimiocinas através do PCR Multiplex em tempo real foram selecionados 21 genes (Apêndice A) expressos em macrófagos conforme descrito na literatura: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , TGF- β (Abbas, Lichtman e Pillai, 2008), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) (Kumar e Clark, 1998 *apud* Parkin e Cohen, 2001), CCL5 (RANTES) (Keophiphath *et al.*, 2010), CCR2 (Willenborg *et al.*, 2012), CCR4 (Trujillo *et al.*, 2008), CCR5 (Tuttle *et al.*, 1998), NOS (Stuehr *et al.*, 1991), TLR4 e TLR9 (Lorenz *et al.*, 2002).

Na análise comparativa entre as várias cepas (Figuras 6.16-6-21), poucas diferenças na expressão gênica de citocinas e quimiocinas foram encontradas. Níveis sugestivamente ($p \leq 0,1$) mais altos foram observados apenas nas culturas infectadas por cepas de *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/2002/NMT-RBO005 (IL-1 α , $p = 0,072$; $p =$ CCL5, $p = 0,0539$; G-CSF, $p = 0,063$) e MHOM/BR/2000/LTCP13396 (IL-1 α , $p = 0,099$), em comparação às culturas não infectadas. De acordo Voronov *et al.* (2010), a citocina IL-1 é um mediador do processo inflamatório secretada por macrófagos, que inicia e propaga o processo inflamatório induzindo a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e leucócitos. Os referidos autores demonstraram o em um estudo com camundongos deficientes em IL-1 α e IL-1 β que a atividade destas moléculas contribui para o agravamento do quadro inflamatório da doença. Kautz-Neu *et al.* (2010) afirmam que IL-1 α se faz necessária no desenvolvimento da resposta Th1 e na produção de IFN- γ por células T CD4⁺ naivas em infecções em camundongos BALB/c. A CCL5 é uma quimiocinas com perfil inflamatório, quimioatraente para linfócitos T, células NK, monócitos, basófilos e eosinófilos (Krensky e Ahn, 2007). Estes resultados corroboram com os achados de Costa-Silva *et al.* (2014), que observaram expressão elevada de CCL5 em lesões de pacientes com LC causada por espécies do subgênero *Viannia*. A citocina G-CSF frequentemente é induzida em uma infecção e participa da regulação da granulopoiese e maturação de neutrófilos (England *et al.*, 2012; Schuettpelez *et al.*, 2014). Neste trabalho, a análise intraespecífica destas citocinas e quimiocinas, sugere um perfil de resposta pró-inflamatória contra as cepas MHOM/BR/2002/NMT-RBO005 e MHOM/BR/2000/LTCP13396 de *L. (V.) braziliensis*, que pode ser

associado com o recrutamento e ativação de leucócitos para o local da infecção, maturação de neutrófilos e produção de IFN- γ por células T CD4⁺, numa tentativa de defesa do hospedeiro. Vale ressaltar que nenhuma cepa de *L. (L.) amazonensis* mostrou níveis das diversas citocinas e quimiocinas testadas sugestivamente ($p \leq 0,1$) diferentes das culturas não infectadas.

Na análise comparativa do perfil de citocinas e quimiocinas entre as espécies e o controle não infectado (Figura 6.22-6.24), observou-se expressão gênica nas culturas estimuladas por *L. (V.) braziliensis* significativa ou sugestivamente maior do que o controle não infectado, diferindo das infecções por *L. (L.) amazonensis*, nas quais não houve modulação com diferença estatística, seja na comparação entre as espécies ou entre a espécie *L. (L.) amazonensis* e o controle não infectado.

Nas culturas estimuladas por *L. (V.) braziliensis* foi observada expressão gênica significativamente maior das citocinas IL-1 α ($p = 0,021$), G-CSF ($p = 0,0329$), IL-6 ($p = 0,045$) e da NOS ($p = 0,0329$) em relação ao controle não infectado. A citocina IL-1 α contribui para o desenvolvimento da resposta imune Th1 e produção de IFN- γ por células T CD4⁺ naíves em camundongos BALB/c infectados por *L. major* (Kautz-Neu *et al.*, 2010). Além disso, Kostka *et al.* (2006), demonstraram em infecções com *L. major*, que administração de IL-1 em baixas doses no início da doença promove o desenvolvimento de resposta Th1, enquanto a administração de em fases tardias, favorece desenvolvimento de resposta Th2. A citocina G-CSF participa da regulação da granulopoiese e maturação de neutrófilos (England *et al.*, 2012). A citocina IL-6 favorece a ativação e/ou diferenciação de macrófagos e células T, diferenciação terminal de células B e estimula formação de colônias hematopoiéticas fortalecendo o efeito de outros fatores hematopoiéticos (Van Snick, 1990). Segundo Saha, Mukhopadhyay e Chatterjee (2011), nas leishmanioses, a IL-6 atua como uma potente citocina pró-inflamatória, envolvida nos processos de geração de NO e ativação dos macrófagos. A enzima NOS catalisa a síntese de NO a partir do substrato L-arginina. Uma das funções mais importantes do NO é a sua atividade microbicida (Genestra *et al.*, 2006), participando inclusive da proteção contra *Leishmania*. Essas observações mostram que estas citocinas e a enzima NOS apresentam um perfil de resposta pró-inflamatória, que contribui para o controle da infecção e morte do parasita.

A expressão da citocina IL-10 ($p = 0,093$), da quimiocina CCL3 ($p = 0,063$) e dos receptores de quimiocinas CCR2 ($p = 0,072$) e CCR5 ($p = 0,084$) nas culturas

estimuladas por *L. (L.) braziliensis* foram maiores do que o controle com um nível de significância sugestivo. A IL-10, como dito anteriormente, inibe a apresentação de antígenos e a produção de IL-2, IFN- γ , IL-12, IFN- α , IL-1, IL-6 e TNF- α , possuindo um efeito inibitório sobre atividade leishmanicida dos macrófagos. A CCL3 é secretada principalmente por macrófagos e está envolvida no desenvolvimento de células Th1, ativando células NK e células T (Dorner *et al.*, 2002). Ji, Sun e Soong (2003) demonstram que CCL3 induz atividade leishmanicida em macrófagos murinos através da geração de NO e afirmam que os ligantes do receptor CCR5 (CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β e CCL5/RANTES) promovem a diferenciação de células Th1. Sato *et al.* (2000) e Conrad *et al.* (2007) demonstraram que MCP-1/CCR2 atua na proteção contra *Leishmania*, e que camundongos resistentes à infecção por *L. major* se tornam susceptíveis após supressão do receptor CCR2. Dentre as citocinas, quimiocinas e receptores de quimiocinas com nível de significância sugestivo, há mediadores que são associados à resposta pró-inflamatória, como o CCL3, CCR5 e CCR2; e aquele que se relaciona à resposta reguladora, como a IL-10. Na LTA humana causada por *L. (V.) braziliensis*, ocorre o predomínio de resposta imune Th1 com alta produção de IFN- γ , resultando na ativação de macrófagos e eliminação dos parasitas (Silveira, Lainson e Corbett, 2004). Já a IL-10 é um antagonista dos efeitos do IFN- γ (Gomes-Silva *et al.*, 2007), representando a resposta reguladora que acompanha a resposta pró-inflamatória em relação positiva. Em culturas de células de pacientes com LTA produzida por *L. (V.) braziliensis* estimuladas por antígeno solúvel total desta espécie, Antonelli *et al.* (2004) encontraram correlações positivas e significantes entre linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ ou TNF- α e de IL-10, sugerindo uma função reguladora deste último. Castellucci *et al.* (2006), afirmam que a regulação da resposta imune celular na leishmaniose depende do equilíbrio entre citocinas e quimiocinas pró e anti-inflamatórias, contribuindo para a cura, minimizando os danos e as possibilidades de reativação da doença. No presente trabalho, os dados referentes à expressão gênica da IL-10 com nível de significância sugestiva corroboram os resultados dos referidos autores, que ainda afirmam que os principais mediadores envolvidos na regulação da resposta pró-inflamatória são as citocinas IL-10 e TGF- β .

Neste trabalho, portanto, se observou um aumento da expressão gênica de citocinas, quimiocinas, receptores de quimiocinas e da enzima NOS apenas nas culturas infectadas por *L. (V.) braziliensis*, em contraste com as culturas infectadas

pelas cepas de *L. (L.) amazonensis*, nas quais não foi evidenciada nenhuma diferença significativa ou sugestiva da expressão gênica de nenhum alvo em relação às culturas não infectadas.

A partir dos dados aqui referidos, nota-se que houve grande diferença entre o perfil de citocinas e quimiocinas caracterizados através do Luminex (Figura 6.14) e do PCR Multiplex em tempo real (Figuras 6.16-6.21). Foram observadas diferenças, por exemplo, na expressão de algumas citocinas ou quimiocinas que foram avaliadas através dos dois métodos: a quimiocina CCL5 com $p = 0,0539$ na infecção por MHOM/BR/2002/NMT-RBO005 no PCR Multiplex em tempo real, enquanto no Luminex só foi expressa na infecção pelas cepas MCAN/BR/1998/R619 e MHOM/BR/2000/LTCP13396; G-CSF com $p = 0,063$ na infecção por MHOM/BR/2002/NMT-RBO005, enquanto no Luminex, o controle não infectado apresentou a maior dosagem; IL-1 α , expressa nas infecções por MHOM/BR/2000/LTCP13396 ($p = 0,099$) e MHOM/BR/2002/NMT-RBO005 ($p = 0,072$), enquanto no Luminex os níveis maiores foram expressos pelas cepas MHOM/BR/2002/NMT-RBO005 e MHOM/BR/2011/RSG. Apesar das importantes diferenças encontradas, notou-se que os resultados do Luminex assim como os do PCR Multiplex em tempo real mostraram níveis aparentemente mais altos de citocinas e quimiocinas nas culturas infectadas com *L. (V.) braziliensis*, em relação àquelas infectadas com *L. (L.) amazonensis*, ainda que não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa nos resultados obtidos por esta técnica.

Na LTA causada por *L. (V.) braziliensis* observa-se que a produção aumentada de IFN- γ , TNF- α e diminuída ou ausente de IL-10, está associada com forte resposta pró-inflamatória, caracterizada pela destruição tecidual e desenvolvimento de lesões cutâneas e mucosas, concomitante à baixa carga parasitária detectada nas lesões (Oliveira *et al.*, 2014). Em contraste, na doença causada por *L. (L.) amazonensis* evidencia-se predomínio de resposta imune de perfil Th2, caracterizada por lesões com grande número de parasitos e pela produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que inibem a ativação dos macrófagos e conseqüentemente contribuem para a sobrevivência do parasito (Silveira *et al.*, 2009). No presente estudo, a caracterização do perfil de citocinas e quimiocinas produzidos por macrófagos murinos infectados com diferentes cepas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* mostrou através de diferentes abordagens, Luminex e PCR Multiplex em tempo real, uma diferença nos padrões de resposta a

estas espécies, sendo a resposta à segunda nitidamente de um perfil mais pró-inflamatório do que a induzida pela primeira, o que está de acordo com os padrões imunopatológicos relacionados a estas espécies que se observam na LTA (Silveira *et al.*, 2004).

8. CONCLUSÕES

Neste trabalho, a análise dos resultados referentes à infecção de macrófagos murinos por diferentes cepas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* permitiu concluir que:

- Em relação à infecção experimental de hamsters, as cepas de *L. (L.) amazonensis* se mostraram mais virulentas que as cepas de *L. (V.) braziliensis*, porém sem diferença estatisticamente significativa.
- Quanto ao cultivo axênico *in vitro*, os resultados sugerem que *L. (L.) amazonensis* atingiu a fase estacionária mais cedo que *L. (V.) braziliensis*, se multiplicando mais rapidamente em meio Schneider, porém sem diferenças estatísticas significativas.
- Em relação à carga parasitária intracelular e à taxa de infecção em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, as cepas da espécie *L. (L.) amazonensis* apresentaram maior variabilidade intraespecífica do que as da espécie *L. (V.) braziliensis*. Interessantemente, constatou-se que as cepas IFLA/BR/1967/PH8 e MHOM/BR/2011/S55 de *L. (L.) amazonensis* apresentaram diferença significativa quando comparadas entre si quanto à porcentagem de macrófagos infectados.
- Os níveis de nitrito e ureia nas culturas de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com as oito cepas em estudo apresentaram uma correlação inversa significativa e forte, caracterizando as duas vias de ativação macrofágica: clássica e alternativa, respectivamente, e condizendo com o fato de que as duas vias competem pelo mesmo substrato.
- Na análise em conjunto das cepas de cada espécie, verificou-se que a infecção por *L. (V.) braziliensis* modulou nos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c uma resposta predominantemente pró-inflamatória, enquanto que não foi observada alteração na expressão de qualquer dos genes alvos do estudo na infecção com a espécie *L. (L.) amazonensis* em relação às culturas controle não infectadas.

9. PERSPECTIVAS

1. Identificar associações entre características do perfil de citocinas e quimiocinas produzido pelas células apresentadoras de antígenos estudadas (macrófagos e células dendríticas) e as diferentes características de infectividade/virulência das várias cepas em estudo, tais como: carga parasitária intracelular, taxa de infecção de macrófagos, produção de óxido nítrico (NO) e atividade de arginase. Pretende-se realizar esta meta com os dados obtidos no presente estudo. Como esta análise seria muito mais complexa e elaborada, realizá-la antes da defesa implicaria em um atraso ainda maior na conclusão do mestrado. Mas será feita em seguida, visando a publicação dos resultados.
2. Caracterizar o perfil de citocinas e quimiocinas produzido por células dendríticas murinas infectadas com diversas cepas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* por PCR Multiplex em tempo real. A caracterização das respostas de células dendríticas à infecção com as principais espécies de *Leishmania* causadoras de doença humana no Brasil era um dos objetivos do projeto original, mas o curto período do mestrado não foi suficiente para realizá-lo. No entanto, durante este período, estabelecemos no laboratório a metodologia de cultivo e caracterização de populações de células dendríticas murinas. A caracterização das respostas de células dendríticas à infecção com diferentes cepas e espécies de *Leishmania* envolverá uma etapa posterior de trabalho experimental.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia: celular e molecular*. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. 564p.

Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Napolitani G. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nature Immunology*. 2007; 8:639-46.

Afonso LC, Scott P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun*. 1993; 61:2952-9.

Aguilera M, Darby T, Melgar S. The complex role of inflammasomes in the pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases - Lessons learned from experimental models. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014; pii:S1359-6101(14)00036-7.

Alexander J, Bryson K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunology Letters*. 2005; 99:17-23.

Almeida TF, Palma IC, Mendez IC, Noronha-Dutra AA, Veras PST. *Leishmania amazonensis* fails to induce the release of reactive oxygen intermediates by CBA macrophages. *Parasite Immunology*. 2012; 34:492-8.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*. 2012; 7:1-12.

Alves CR, Benevolo-De-Andrade TC, Alves JL, Pirmez C. Th1 and Th2 immunological profile induced by cysteine proteinase in murine leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2004 Mar; 26(3):127-35.

Amorim FM, Rodrigues YK, Barbosa TP, Nérís PL, Caldas JP, Sousa SC, Leite JA, Rodrigues-Mascarenhas S, Vasconcellos ML, Oliveira MR, Morita-Baylis-Hillman adduct shows in vitro activity against *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with a reduction in IL-6 and IL-10 but independent of nitric oxide. *Parasitology*. 2013 Jan; 140(1):29-38.

Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Gollob KJ. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol*. 2004 May; 136(2):341-8.

Assche T, Deschacht M, da Luz RAI, Maes L, Cos P. Leishmania-macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radical Biology & Medicine*. 2011; 51:337-51.

Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, de Jesus AR, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect. Immun*. 2002; 70(12):6734-40.

- Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*. 1998; 392:565-8.
- Ballestieri FMP, Queiroz AR, Scavone C, Costa VM, Barral-Netto M, Abrahamsohn IA. *Leishmania (L) amazonensis* -induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect*. 2002; 4(1):23-9.
- Banūls AL, Hide M, Tibayrenc M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. *International Journal for Parasitology*. 1999; 29:1137-47.
- Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Júnior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM, Johnson WD. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1991; 44:536-46.
- Barral A, Teixeira M, Reis P, Vinhas V, Costa J, Lessa H, Bittencourt AL, Reed S, Carvalho EM, Barral-Netto M. Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Pathol*. 1995; 147:947-54.
- Basso D, Pesarin F, Salmaso L, Solari A. Permutation Tests for Stochastic Ordering and ANOVA. *Lecture Notes in Statistics*. 2009; 194:1-35.
- Bates PA, Rogers ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr. Mol. Med*. 2004; 4:601-9.
- Bedoya SK, Lam B, Lau K, Larkin III J. Th17 Cells in Immunity and Autoimmunity. *Clin Dev Immunol*. 2013; 2013:986789.
- Bertho AL, Cysne L, Coutinho SG. Flow cytometry in the study of the interaction between murine macrophages and the protozoan parasite *Leishmania amazonensis*. *J Parasitol*. 1992 Aug; 78(4):666-71.
- Birnbaum R, Craft N. Innate immunity and *Leishmania* vaccination strategies. *Dermatologic Clinics*. 2011; 29:89-102.
- Biron CA, Gazzinelli RT. Effects of IL-12 in immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. *Curr Opin Immunol*. 1995; 7:485-96.
- Bogdan C, Gessner A, Solbach W, Röllinghoff M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol*. 1996; 6:517-25.
- Bogdan C, Röllinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control e evasion. *International Journal for Parasitology*. 1998; 28:121-34.
- Bonfim G, Nascimento C, Costa JML, Carvalho EM, Barral-Neto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 1996; 84:188-94.
- Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010; 125:33-40.

- Brandão-Filho S, Shaw J. Leishmaniasis in Brazil. *Parasitology Today*. 1994; 9:329-30.
- Camara CL, Paes M, Guerra JA, Barbosa MG, Coelho C, Lima B, Brito ME, Brandão Filho SP. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitology Research*. 2011; 108:671-7.
- Carvalho EM, Barral-Neto M, Barral A, Broskyn CI, Bacellar OA. Immunoregulation in Leishmaniasis. *Ciência e Cultura*. 1994; 46:441-5.
- Carvalho AK, Silveira FT, Passero LFD, Gomes CMC, Corbett CEP, Laurenti MD. *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model. *Parasite Immunology*. 2012; 34:395-403.
- Carvalho AM, Magalhães A, Carvalho LP, Bacellar O, Scott P, Carvalho EM. Immunologic response and memory T cells in subjects cured of tegumentary leishmaniasis. *BMC Infect Dis*. 2013 Nov; 13:529.
- Cattand P, Desjeux P, Guzmán MG, Jannin J, Kroeger A, Médiçi A, Musgrove P, Nathan MB, Shaw A, Schofield CJ. Tropical diseases lacking adequate control measures: dengue, leishmaniasis and african trypanosomiasis. In: Jamison DT, Bremen JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, Jha P, Mills A, Musgrove P., editor. *Disease control priorities in developing countries*. Washington (DC): The World Bank and Oxford University Press; 2006. p. 451-66.
- Castellucci L, Menezes E, Oliveira J, Magalhaes A, Guimaraes LH, Lessa M, Ribeiro S, Reale J, Noronha EF, Wilson ME, Duggal P, Beaty TH, Jeronimo S, Jamieson SE, Bales A, Blackwell JM, de Jesus AR, Carvalho EM. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *J Infect Dis*. 2006 Aug; 194(4):519-27.
- Centers for Disease Control and Prevention [homepage na Internet]. CDC - Leishmaniasis - Biology. 2013. [acesso em 20 abr. 2013]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>.
- Chang KP, Reed SG, McGwire BS, Soong L. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop*. 2003 Mar; 85(3):375-90.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews, Microbiology*. 2007; 5:873-82.
- Colmenares M, Kar S, Goldsmith-Pestana K, McMahon-Pratt D. Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002; 1:3-7.
- Conrad SM, Strauss-Ayali D, Field AE, Mack M, Mosser DM. *Leishmania*-derived murine monocyte chemoattractant protein 1 enhances the recruitment of a restrictive

population of CC chemokine receptor 2-positive macrophages. *Infect Immun.* 2007 Feb; 75(2):653-65.

Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *Journal of Immunological Methods.* 1994; 174:231-5.

Côrtes, DF. Infecções com baixas doses de *Leishmania amazonensis*: um modelo para o estudo de leishmaniose tegumentar americana [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Bioquímica e Imunologia; 2008.

Costa-Silva MF1, Gomes LI, Martins-Filho OA, Rodrigues-Silva R, Freire Jde M, Quaresma PF, Pascoal-Xavier MA, Mendes TA, Serakides R, Zauli DA, Campi-Azevedo AC, Melo MN, Gontijo CM, Peruhype-Magalhães V, Teixeira-Carvalho A. Gene expression profile of cytokines and chemokines in skin lesions from Brazilian Indians with localized cutaneous leishmaniasis. *Mol Immunol.* 2014 Feb; 57(2):74-85.

Courret N, Lang T, Milon G, Antoine JC. Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. *International Journal for Parasitology.* 2003; 33:1373-83.

Croan DG, Morrison DA, Ellis JT. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Mol Biochem Parasitol.* 1997; 89:149-59.

Cumberbatch M, Kimber I. Dermal tumour necrosis factor- α induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans' cell migration. *Immunology.* 1992; 75:257-63.

Cysne-Finkelstein L, Temporal RM, Alves FA, Leon LL. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Exp Parasitol.* 1998; 89(1):58-62.

Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science.* 1999a; 286:2098-102.

Cyster JG. Chemokines and the homing of dendritic cells to the t cell areas of lymphoid organs. *J. Exp. Med.* 1999b; 189(3):447-50.

da Silva DG. Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania* spp. e análise da atividade leishmanicida de chalconas [dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, 2008.

de Alcântara AC. ELISA indireto e mkDNA PCR-RFLP para o diagnóstico e avaliação da infecção por *Leishmania* sp. em reservatórios domésticos (cães) e silvestres (marsupiais) em Barra do Pojuca, Camaçari, Bahia [dissertação]. Salvador: Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária; 2006.

de Araújo CF, Silva VM, Cronemberger-Andrade A, Aragão-França LS, Rocha VC, Santos PS, Pontes-de-Carvalho L. *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* amastigote extracts differ in their enhancement effect on *Leishmania* infection when injected intradermally. BMC Res Notes. 2014; 7(1):70.

de Bastos RP. Infecção murina por isolados de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*: avaliação da participação de leucotrienos endógenos [dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2008.

Dedet JP, Pratlong F. Protozoa infection. In: Cook G, Zumla A, editors. Manson's Tropical Diseases. Philadelphia: Saunders; 2009. p. 1341-67.

DeKrey GK, Lima HC, Titus RG. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. Infect. Immun. 1998; 66:827-9.

de Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, Brodskyn C, de Oliveira CI. Toward a novel experimental model of infection to study American Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. Infect. Immun. 2005; 73(9):5827-34.

de Oliveira CI, Teixeira MJ, Teixeira CR, de Jesus JR, Rosato AB, da Silva JS, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. Microbes Infect. 2004; 6:977-84.

Desjeux P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 2004; 27:305-18.

England TJ, Abaei M, Auer DP, Lowe J, Jones DR, Sare G, Walker M, Bath PM. Granulocyte-colony stimulating factor for mobilizing bone marrow stem cells in subacute stroke: the stem cell trial of recovery enhancement after stroke 2 randomized controlled trial. Stroke. 2012 Feb; 43(2):405-11.

Dorner BG, Scheffold A, Rolph MS, Huser MB, Kaufmann SH, Radbruch A, Flesch IE, Kroczyk RA. MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Apr; 99(9):6181-6.

Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J Jr, Schriefer A, Machado PR, Lessa H, Carvalho LP, Romano-Silva MA, de Jesus AR, Carvalho EM, Dutra WO. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. Infect Immun. 2005 Dec; 73(12):7853-9.

Favali C, Tavares N, Clarêncio J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn C. *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. J. Leukocyte Biol. 2007; 82:1-6.

Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA. CD56^{bright} natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by

- T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*. 2003; 101(8):3052-7.
- Fernandes AP, Nelson K, Beverley SM. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:11608-12.
- Gama ME, Costa JM, Gomes CMC, Corbett CE. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99(8):889-93.
- Genestra M, Souza WJ, Guedes-Silva D, Machado GM, Cysne-Finkelstein L, Bezerra RJ, Monteiro F, Leon LL. Nitric oxide biosynthesis by *Leishmania amazonensis* promastigotes containing a high percentage of metacyclic forms. *Arch Microbiol*. 2006 Jun; 185(5):348-54.
- Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, Carvalho LP, Delavechia T, Carvalho EM, Bacellar O. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infect Dis*. 2012 Mar; 12:75.
- Gollnick SO, Cheng HL, Grande CC, Thompson D, Tomasi TB. Effects of transforming growth factor-beta on bone marrow macrophage Ia expression induced by cytokines. *J. Interferon Cytokine Res*. 1995; 15:485-91.
- Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão RP, Plácido-Pereira RM, Da Cruz AM. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology*. 2013; 140:771-9.
- Gomes-Silva A, de Cássia Bittar R, Dos Santos Nogueira R, Amato VS, da Silva Mattos M, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol*. 2007 Sep; 149(3):440-4.
- Gómez-Galindo AM, Delgado-Murcia LG. Body weight as a determinant of clinical evolution in hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Leishmania (Viannia) panamensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 2013; 55(5):357-361.
- Gonzalez-Lombana C, Gimblet C, Bacellar O, Oliveira WW, Passos S, Carvalho LP, Goldschmidt M, Carvalho EM, Scott P. IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection. *PLoS Pathog*. 2013 March; 9(3): e1003243.
- Gramiccia M, Gradoni L, Pozio E. *Leishmania infantum sensu lato* as an agent of cutaneous leishmaniasis in Abruzzi region (Italy). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987; 81:235-7.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 1982; 126:131-8.
- Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, Wasunna MK, Bryceson ADM. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and

treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2:494-501.

Guerra JAO, Prestes SR, Silveira H, Coelho LIARC, Gama P, Moura A, Amato V, Barbosa MG, Ferreira LCL. Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(3):e980.

Gumy A, Louis JA, Launois P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *Int J Parasitol.* 2004 Mar; 34(4):433-44.

Handman E. Cell biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology.* 2001; 44:1-39.

Haber ME, Daher CF, Karam MC, Baroody GM. *Leishmania major*: Interleukin-13 increases the infection-induced hyperalgesia and the levels of interleukin-1 β and interleukin-12 in rats. *Experimental Parasitology.* 2009; 121:224-9.

Hotez PJ, Remme JH, Buss P, Alleyne G, Morel C, *et al.* Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clin Infect Dis.* 2004; 38:871-8.

Ibrahim MAA, Chain BM, Katz DR. The injured cell: the role of the dendritic cell system as a sentinel receptor pathway. *Immunology Today.* 1995; 16(4):181-6.

Iniesta, V, Gomez-Nieto LC, Corraliza I. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J. Exp. Med.* 2001; 193: 777-84.

Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelen J, Miron C, Alonso C, Corraliza, I. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol.* 2002; 24(3):113-18.

James AM, Hsu HT, Dongre P, Uzel G, Mace EM, Banerjee PP, Orange JS. Rapid activation receptor- or IL-2-induced lytic granule convergence in human natural killer cells requires Src, but not downstream signaling. *Blood.* 2013 Apr; 121(14):2627-37.

Ji J, Sun J, Soong L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun.* 2003 Aug; 71(8):4278-88.

Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in parasitology.* 2006; 22(9):439-45.

Katara GK, Raj A, Kumar R, Avishek K, Kaushal H, Ansari NA, Bumb RA, Salotra P. Analysis of localized immune responses reveals presence of Th17 and Treg cells in cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. *BMC Immunol.* 2013; 14:52.

Kautz-Neu K, Kostka SL, Dinges S, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E. IL-1 signalling is dispensable for protective immunity in *Leishmania*-resistant mice. *Exp Dermatol*. 2011 Jan; 20(1):76-8.

Kedzierski L, Zhu Y, Handman E. *Leishmania* vaccines: progress and problems. *Parasitology*. 2006; 133 Suppl:S87-112.

Keophiphath M, Rouault C, Divoux A, Clément K, Lacasa D. CCL5 Promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30:39-45.

Kima PE. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int J Parasitol*. 2007; 37(10): 1087-96.

Koch F, Stanzl U, Jennewein P, Janke K, Heufler C, Kampgen E, Romani N, Shuler G. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med*. 1996; 84:741-6.

Kostka SL, Knop J, Konur A, Udey MC, von Stebut E. Distinct roles for IL-1 receptor type I signaling in early versus established *Leishmania major* infections. *J Invest Dermatol*. 2006 Jul; 126(7):1582-9.

Krensky AM, Ahn YT. Mechanisms of disease: regulation of RANTES (CCL5) in renal disease. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2007 Mar; 3(3):164-70.

Kropf, P, Fuentes JM, Fahrnich E, Arpa L, Herath S, Weber V, Soler G, Celada A, Modolell M, Muller I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *FASEB J*. 2005; 19:1000-2.

Kumar P, Clark ML, editors. *Clinical Medicine*. 4th. London: Baillière Tindall; 1998.

Kurashima Y, Goto Y, Kiyono H. Mucosal innate immune cells regulate both gut homeostasis and intestinal inflammation. *Eur J Immunol*. 2013; 43(12):3108-15.

Laison R, Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Lumsden WHR, Evans DA, editors. *Biology of the Kinetoplastida*. New York: Academic Press; 1979. p.1-116.

Laison R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The leishmaniasis in biology and medicine: Biology and epidemiology*. London: Academy Press; 1987. p. 1-120.

Laison R, Shaw JJ. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). *Ann. Parasitol. Hum. Comp*. 1988; 63:134-45.

Laison R, Shaw JJ. New World leishmaniasis the neotropical *Leishmania* species. In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D, editors. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Parasitology*. 9th ed. New York: Oxford University Press; 1998. p. 242-66.

Larkin III J, Ahmed CM, Wilson TD, Johnson HM. Regulation of interferon gamma signaling by suppressors of cytokine signaling and regulatory T cells. *Front Immunol.* 2013 Dec; 4:469.

Laskay T, Diefenbach A, Rollinghoff M, Solbach W. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25: 2220–7.

Launois P, Swihart KG, Milon G, Louis JA. Early production of IL-4 in susceptible mice infected with *Leishmania major* rapidly induces IL-12 unresponsiveness. *J Immunol.* 1997 Apr; 158(7):3317-24.

Leopoldo PT, Machado PR, Almeida RP, Schriefer A, Giudice A, de Jesus AR, Ho JL, Guimarães LH, Bacellar O, Carvalho EM. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *BMC Infect Dis.* 2006 Apr; 6:75.

Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune response by TGF- β . *Ann Rev Immunol.* 1998; 16:137-61.

Liu D, Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2012; 2(83):1-8.

Lorenz E, Patel DD, Hartung T, Schwartz DA. Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient murine macrophage cell line as an in vitro assay system to show TLR4-independent signaling of *Bacteroides fragilis* lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 2002 Sep; 70(9):4892-6.

Madeira MF, Uchôa CMA, Leal CA, Silva RMM, Duarte R, Magalhães CM, Serra CMB. *Leishmania (Viannia) braziliensis* in naturally infected dogs. *Rev da Soc Bras de Med Tropical.* 2003; 36(5): 551-5.

Maslov DA, Votýpka J, Yurchenko V, Lukes J. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trends in Parasitology.* 2013; 29(1):43-52.

Matta NE, Cysne-Finkelstein L, Machado GMC, Da-Cruz AM, Leon L. Differences in the antigenic profile and infectivity of murine macrophages of *Leishmania (Viannia)* parasites. *J. Parasitol.* 2010 Jun; 96(3):509-15.

McConville MJ, Schnur LF, Jaffe C, Schneider P. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem. J.* 1995; 310:807-18.

McConville MJ, Turco SJ, Ferguson MAJ, Sacks DL. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J.* 1992; 11:3593-3600.

Mckenzie ANJ, Culpepper JA, De Waal MR, Britret F, Punnonent J, Aversat G, Sato

A, Dang W, Cockst BG, Menon S, De Vriest JE, Banchereaut J, Zurawski G. Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993; 90:3735-9.

Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. N Engl J Med. 2000; 343(5):338-44.

Ministério da Saúde (Brasil). Portaria nº. 2.472, de 31 de agosto de 2010. Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelecer fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde. Diário Oficial da União 1 set. 2010; Seção 1.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2007.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2006.

Moraes MAP, Silveira FT. Histopathology of the localized form of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1994; 36:459-63.

Moreno I, Domíngue M, Cabañes D, Aizpurua C, Toraño A. Kinetic analysis of ex vivo human blood infection by *Leishmania*. PLoS Negl Trop Dis. 2010 July; 4(7):e743.

Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, Okwor IB, Beverley S, Uzonna JE. Infection with arginase-deficient *Leishmania major* reveals a parasite number-dependent and cytokine-independent regulation of host cellular arginase activity and disease pathogenesis. J Immunol. 2009; 183(12):8068-76.

Murray HW, Berman JB, Davies CR, Saraiva NG. Advances in leishmaniasis. The Lancet. 2005; 336:1561-77.

Murray HW, Nathan CF. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen vs. oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. J. Exp. Med. 1999; 189:741-6.

Noben-Trauth N. Susceptibility to *Leishmania major* infection in the absence of IL-4. Immunology Letters. 2000; 75:41-4.

Nylén S, Sacks DL. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. Trends in Immunology. 2007; 28:378-84.

Oliveira WN, Ribeiro LE, Schieffer A, Machado P, Carvalho EM, Bacellar O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. Cytokine. 2014 Apr; 66(2):127-32.

Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. Clin. Microbiol. Rev. 2005; 18(2):293-305.

Osorio YS, Gonzalez J, Gama VL, Travi B. Reinfection in American cutaneous leishmaniasis: evaluation of clinical outcomes in the hamster model. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 93:353-6.

Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. Lancet. 2001; 357: 1777-89.

Passero LFD, Carvalho AK, Bordon MLAC, Bonfim-Melo A, Toyama MH, Corbett CEP, Laurenti MD. *Leishmania (Viannia) shawi* purified antigens confer protection against murine cutaneous leishmaniasis. Inflamm. Res. 2012; 61:255-63.

Pereira BA, Alves CR. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Vet Parasitol. 2008 Dec; 158(4):239-55.

Peters NC, Sacks DL. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. Cell. Microbiol. 2009; 11:1290-6.

Pimenta PFP, Secundino NFC, Blanco EEN. Interação *Leishmania*-hospedeiro invertebrado. In: Rangel EF, Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 291-311.

Prajeeth CK, Haeberlein S, Sebald H, Schleicher U, Bogdan C. *Leishmania*-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines, but not of NK cell cytotoxicity. Infect Immun. 2011; 79:2699-708.

Pratlong F, Bastien P, Perello R, Lami P, Dedet JP 1995. Human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani sensu stricto* in Yemen. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995; 89:398-9.

Proudfoot L, Nikolaev AV, Feng GJ, Wei XQ, Ferguson MAJ, Brimacombe JS, Liew FY. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996; 93:10984-9.

Ramazeilles C, Juliano L, Chagas JR, Rabinovitch M. The anti-leishmanial activity of dipeptide esters on *Leishmania amazonensis* amastigotes. Parasitology. 1990; 100(Pt2):201-7.

Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(7):937-54.

R Development Core Team [homepage na Internet]. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013. Disponível em: <http://www.R-project.org>.

Ready PD. Should sand fly taxonomy predict vectorial and ecological traits? Journal of Vector Ecology. 2011; 36(1):17-22.

Rebrikov DV, Trofimov DY. Real-time PCR: a review of approaches to data analysis, Appl. Biochem. Microbiol. 2006; 42:455-63.

Ritter U, Osterloh A. A new view on cutaneous dendritic cell subsets in experimental leishmaniasis. Med Microbiol Immunol. 2007; 196:51-9.

Ritz C, Spiess AN. qPCR: an R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. Bioinformatics. 2008; 24:1549-51.

Roake JA, Rao AS, Morris PJ, Larsen CP, Hankins DF, Austyn JM. Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and Interleukin 1. J. Exp. Med. 1995; 181:2237-47.

Roitt IM, Delves PJ. Roitt: Fundamentos de imunologia. 10th. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2004.

Russell DG. *Mycobacterium* and *Leishmania*: Stowaways in the endosomal network. Trends in Cell Biology. 1995; 5:125-8.

Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. Science. 1984 Mar; 223(4643):1417-9.

Sacks DL, da Silva RP. The generation of infective stage *Leishmania major* promastigotes is associated with the cell-surface expression and release of a developmentally regulated glycolipid. J Immunol. 1987; 139:3099-106.

Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nature. 2002; 2:845-58.

Saha P, Mukhopadhyay M, Chatterjee M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. Int. Immunopharmacol. 2011; 11:1668-79.

Saïd-Sadier N, Ojcius DM. Alarmins, inflammasomes and immunity. Biomed J. 2012; 35(6):437-49.

Sakaguchi, S. Regulatory T cells, history and perspectives. In: Kassiotis G, Liston A., editor. Regulatory T Cells. Methods Mol Biol. 2011; 707:3-17.

Sakaguchi S, Vignali DAA, Rudensky AY, Niec RE, Waldmann H. The plasticity and stability of regulatory T cells. Nat Rev Immunol. 2013 Jun; 13(6):461-7.

Sato N, Ahuja SK, Quinones M, KostECKI V, Reddick RL, Melby PC, Kuziel WA, Ahuja SS. CC chemokine receptor (CCR)2 is required for Langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells: absence of CCR2 shifts the *Leishmania major*-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, B cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. J. Exp. Med. 2000; 192:205-18.

Santiago HC, Oliveira CF, Santiago L, Ferraz FO, de Souza DG, de-Freitas LA, Afonso LC, Teixeira MM, Gazzinelli RT, Vieira LQ. Involvement of the chemokine

- RANTES (CCL5) in resistance to experimental infection with *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 2004; 72(8):4918-23.
- Schall TJ, Proudfoot AEI. Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors. *Nature.* 2011; 11:355-63.
- Schnur LF, Morsy TA, Feinsod FM, Missiry AG. Is *Leishmania major* the cause of infantile kala-azar in Alexandria, Egypt? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985; 79:134-5.
- Schuettpelz LG, Borgerding JN, Christopher MJ, Gopalan PK, Romine MP, Herman AC, Woloszynek JR, Greenbaum AM, Link DC. G-CSF regulates hematopoietic stem cell activity, in part, through activation of toll-like receptor signaling. *Leukemia.* 2014 Feb 12. [Epub ahead of print].
- Seder RA, Paul WE, Davis MM, de St. Groth BF. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4⁺ T cells from T cell receptor transgenic mice. *Exp. Med.* 1992; 176:1091-8.
- Seitz M, Loetscher P, Dewald B, Towbin H, Baggiolini M. Opposite effects of interleukin-13 and interleukin-12 on the release of inflammatory cytokines, cytokine inhibitors and prostaglandin E from synovial fibroblasts and blood mononuclear cells. *European Journal of Immunology.* 1996; 26:2198-202.
- Shen X, Du J, Guan W, Zhao Y. The balance of intestinal Foxp3⁺ regulatory T cells and its biological significance. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014 Feb 3. [Epub ahead of print].
- Shevach EM. Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* 2009; 30(5):636-45.
- Shortman K, Caux C. Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants. *Stem Cells.* 1997; 15:409-19.
- Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature.* 2007; 7:19-30.
- Silva R, Sacks DL. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect. Immun.* 1987; 55:2802-6.
- Silveira FT, Blackwell JM, Ishikawa EA, Braga R, Shaw JJ, Quinnell RJ, Soong L, Kima P, McMahon-Pratt D, Black GF, Shaw M-A. T cell responses to crude and defined leishmanial antigens in patients from the Lower Amazon region of Brazil infected with different species of *Leishmania* of the subgenera *Leishmania* and *Viannia*. *Parasite Immunology.* 1998; 20:19-26.
- Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2004; 99(3):239-51.
- Silveira FT, Lainson R, Gomes CMC, Laurenti MD, Corbett CE. Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous

Leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008; 102:1075-80.

Silveira FT, Lainson R, Gomes CMC, Laurenti MD, Corbett CE. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology.* 2009; 31:423-31.

Skeen MJ, Miller MA, Shinnick TM, Ziegler HK. Regulation of murine macrophage IL-12 production. Activation of macrophages in vivo, restimulation in vitro, and modulation by other cytokines. *Journal of Immunology.* 1996; 156(3):1196-206.

Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science.* 1988; 240(4856): 1169-76.

Squires K.E., Schreiber R.D., McElrath M.J., Rubin B.Y., Anderson S.L., Murray H.W. Experimental visceral leishmaniasis: role of endogenous interferon- γ in host defense and tissue granulomatous response. *J. Immunol.* 1989; 143:4244-9.

Soares-Bezerra RJ, da Silva ef, A. Echevarria, L. Gomes-da-Silva, L. Cysne-Finkelstein, F.P. Monteiro, L.L. Leon, M. Genestra. Mesoionic 4-phenyl-5-(cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride derivative salts on the activities of the nitricoxide synthase and arginase of *Leishmania amazonensis* *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 23 (3) (2008), pp. 328-33

Solbach W, Laskay T. The host response to *Leishmania* infection. *Advances in Immunology.* 2000; 74:275-317.

Sousa CR, Stahl PD, Austyn JM. Phagocytosis of antigens by langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* 1993; 178:509-19.

Souza VL, Souza JA, Silva TMC, Veras PST, Freitas LAR. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes and Infection.* 2000; 2:1807-15.

Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 1991; 9:271-96.

Stenger S, Rölinghoff M. Role of cytokines in the innate immune response to intracellular pathogens. *Annals of Rheumatic Diseases.* 2001; 60(3):43-6.

Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Sep; 88(17):7773-7.

Su DL, Lu ZM, Shen MN, Li X, Sun LY. Roles of pro- and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of SLE. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2012; 2012:1-15.

Sundrud MS, Trivigno C. Identity crisis of Th17 cells: many forms, many functions, many questions. *Semin Immunol.* 2013; 25(4):263-72.

- Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol.* 1990; 145(11):3796-806.
- Taxonomy Browser [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2013. *Leishmania*; [citado em 2013 Abr. 24]; [aproximadamente 1 tela]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>.
- Teixeira MJ, Fernandes JD, Teixeira CR, Andrade BB, Pompeu ML, da Silva JS, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. *Infect. Immun.* 2005; 73:1191-5.
- Trujillo G, O'Connor EC, Kunkel SL, Hogaboam CM. A novel mechanism for CCR4 in the regulation of macrophage activation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 2008 May; 172(5):1209-21.
- Tuon FF, Amato VS. Neglected tropical diseases: beyond the wars. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008; 50:313-4.
- Tuttle DL, Harrison JK, Anders C, Sleasman JW, Goodenow MM. Human expression of CCR5 increases during monocyte differentiation and directly mediates macrophage susceptibility to infection by immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 1998; 72(6):4962.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3(7):research0034.1–research0034.11.
- Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol.* 1990; 8:253-78.
- Voronov E, Dotan S, Gayvoronsky L, White RM, Cohen I, Krelin Y, Benchetrit F, Elkabets M, Huszar M, El-On J, Apte RN. IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. *Int Immunol.* 2010 Apr; 22(4):245-57.
- Wang P, Zheng SG. Regulatory T cells and B cells: implication on autoimmune diseases. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013 Nov; 6(12):2668-74.
- Willenborg S, Lucas T, van Loo G, Knipper JA, Krieg T, Haase I, Brachvogel B, Hammerschmidt M, Nagy A, Ferrara N, Pasparakis M, Eming SA. CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood.* 2012 Jul; 120(3):613-25.
- World Health Organization. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. Geneva: WHO; 2010. (WHO. Technical Report).
- World Health Organization. Fact sheet N°375 [Internet]. Geneva: WHO; [atualizado em 2014 Jan; citado em 2014 Feb 20]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.

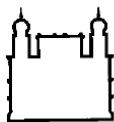
Wurtz O, Bajénoff M, Guerder S. IL-4-mediated inhibition of IFN-gamma production by CD4+ T cells proceeds by several developmentally regulated mechanisms. *Int Immunol*. 2004 Mar; 16(3):501-8.

Yamakami K, Akao S, Tadakuma T, Nitta Y, Miyazaki J, Yoshizawa N. Administration of plasmids expressing interleukin-4 and interleukin-10 causes BALB/c mice to induce a T helper 2-type response despite the expected T helper 1-type response with a low-dose infection of *Leishmania major*. *Immunology*. 2002; 105:515-23.

Yoshie O, Imai T, Nomiyama H. Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors. *Journal of Leukocyte Biology*. 1997; 62:634-44.

Zhang K, Barron T, Turco SJ, Beverley SM. The LPG1 gene family of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*. 2004 Jul; 136(1):11-23.

ANEXO A – CERTIFICADOS DE AUTENTICAÇÃO DAS CEPAS UTILIZADAS NO ESTUDO



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Oswaldo Cruz



Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC – WDCM 731
 Serviço de isolamento, cultivo, tipagem e doação de *Leishmania*

RELATÓRIO DE ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* POR ELETROFORESE DE ENZIMAS

Solicitação (s) nº 004/2013

ER11/2013

Solicitante (nome e instituição): Sergio Coutinho Furtado de Mendonça
 Laboratório de Imunoparasitologia – IOC - Fiocruz

Data da entrada da amostra na CLIOC: 20/03/2013

Data da liberação do resultado: 02/04/2013

Amostra	Ordem de Entrada CLIOC	Forma de recebimento	Resultado da caracterização	IOC-L
LTB 2P	18/2013	Cultura	<i>L. amazonensis</i>	---
PH8	19/2013	Cultura	<i>L. amazonensis</i>	---
---	---	---	---	---
---	---	---	---	---
---	---	---	---	---
---	---	---	---	---
---	---	---	---	---
---	---	---	---	---
---	---	---	---	---

Enzimas ensaiadas:

ME	MDH	ACP	G6PDH	PGM	6PGDH	GPI	FUM	MPI
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IDH NADP	IDH NAD	PEPD	PEPD2	PEPD3	ACON	HK	NH	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Método utilizado: MLEE (multilocus enzyme electrophoresis) seguindo protocolo descrito em Cupolillo et al 1994. Am. J. Trop. Med. Hyg.

Registro do ensaio:

Formulário de ensaio isoenzimático [Form-LRNT/CLIOC-027-0001]: 11/2013

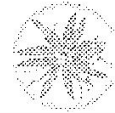
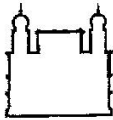
Executado por:
 Mariana Côrtes Boité
 Tecnologista II

Conferido por:
 Elisa Cupolillo
 Pesquisador - Curadora CLIOC

Solicita-se a citação, na seção de metodologia, da "Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz – CLIOC" nos projetos científicos, teses, dissertações e artigos publicados, em função da utilização das amostras de *Leishmania* doadas por esse laboratório/coleção. Favor acessar <http://clioc.fiocruz.br>, menu SERVIÇOS, para dados completos da citação.

Rio de Janeiro, 02 de abril de 2013

Av. Brasil, 4.365 Manguinhos – Rio de Janeiro, RJ – CEP 21040-360 – Brasil
 Pavilhão Leônidas Deane, 5º andar – salas 509,502; 1º andar – sala 116
 Tel.: (0055) (21) 3865-8177 / 3865-8195 – Fax: (0055) (21) 3865-8195



CERTIFICADO DE AUTENTICAÇÃO

CA 005/2013

Solicitação nº: SC 003/2013

Solicitante (nome e instituição): Sergio Mendonça – Laboratório de Imunoparasitologia

Data da solicitação: 27/02/2013

Data liberação da amostra: 01/04/2013

IOC-L	3311
Referência Internacional	MHOM/BR/2011/S55
Identificação	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>
Método de caracterização	<input checked="" type="checkbox"/> Isoenzimas <input type="checkbox"/> AcMonoclonais <input type="checkbox"/> PCR
Relatório de ensaio nº	
Arquivo de Caracterização MLEE:	Ano: 2013 Página nº: 10
Lote	023/2013
Quantidade	~2mL
Meio de cultura utilizado	Schneider + 20 % de Soro Fetal Bovino + 2% urina
Antibióticos usados	Penicilina + Estreptomicina
Temperatura de cultivo	25°C
Nº Passagens	Desconhecida
Infectividade	<input type="checkbox"/> Positiva <input checked="" type="checkbox"/> Desconhecida
Estado da cultura	+++

Exemplo de Referência Internacional: MHOM/BR/1975/M2903; onde M = Mamaia (classe); HOM = *Homo sapiens* (espécie); BR = Brasil (País onde foi isolada a cepa); 1975 = ano de isolamento; e M2903 = nome ou código da cepa.

Importante: As informações apresentadas neste certificado são garantidas até o momento da saída das amostras da CLIOC.

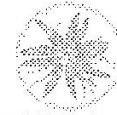
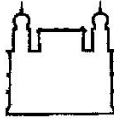
Solicita-se a citação, na seção de metodologia, da "Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC" nos projetos científicos, teses, dissertações e artigos publicados, em função da utilização das amostras de *Leishmania* doadas por esse laboratório/coleção. Favor acessar <http://clioc.fiocruz.br>, menu SERVIÇOS, para dados completos da citação.

É expressamente vetada a doação desta amostra por outras pessoas ou Instituições que não a CLIOC.


 (Nome completo)
 (Cargo)

Anderson Neves dos Santos Falcão
 Parasitologista
 Instituto Oswaldo Cruz
 CEP 21040-360 RJ
 TEL: 1635388

Av. Brasil, 4.365 Manguinhos – Rio de Janeiro, RJ – CEP 21040-360 – Brasil
 Pavilhão Leônidas Deane, 5º andar – salas 509, 502, 1º andar – sala 116
 Tel.: (0055) (21) 3865-8177 / 3865-8195 – Fax: (0055) (21) 3865-8195



CERTIFICADO DE AUTENTICAÇÃO

CA 004/2013

Solicitação nº: SC 003/2013

Solicitante (nome e instituição): Sergio Mendonça – Laboratório de Imunoparasitologia

Data da solicitação: 27/02/2013

Data liberação da amostra: 01/04/2013


IOC-L	2571
Referência Internacional	MHOM/BR/2003/NJS
Identificação	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>
Método de caracterização	<input checked="" type="checkbox"/> Isoenzimas <input type="checkbox"/> AcMonoclonais <input type="checkbox"/> PCR
Relatório de ensaio nº	
Arquivo de Caracterização MLEE:	Ano: 2013 Página nº: 10
Lote	023/2013
Quantidade	~2mL
Meio de cultura utilizado	Schneider + 20 % de Soro Fetal Bovino + 2% urina
Antibióticos usados	Penicilina + Estreptomicina
Temperatura de cultivo	25°C
Nº Passagens	Desconhecida
Infectividade	<input type="checkbox"/> Positiva <input checked="" type="checkbox"/> Desconhecida
Estado da cultura	+++

Exemplo de Referência Internacional: MHOM/BR/1975/M2903; onde M = Mamalia (classe); HOM = *Homo sapiens* (espécie); BR = Brasil (País onde foi isolada a cepa); 1975 = ano de isolamento; e M2903 = nome ou código da cepa.

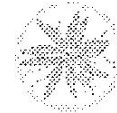
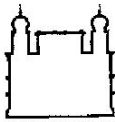
Importante: As informações apresentadas neste certificado são garantidas até o momento da saída das amostras da CLIOC.

Solicita-se a citação, na seção de metodologia, da "Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz – CLIOC" nos projetos científicos, teses, dissertações e artigos publicados, em função da utilização das amostras de *Leishmania* doadas por esse laboratório/coleção. Favor acessar <http://clioc.fiocruz.br>, menu SERVIÇOS, para dados completos da citação.

É expressamente vetada a doação desta amostra por outras pessoas ou instituições que não a CLIOC.


 Mariana Neves dos Santos Falssal
 Tecnologista
 Laboratório de Pesquisas Leishmanioses/IOC
 FIOCRUZ - SAPE 1635388
 (Nome completo)
 (Cargo)

Av. Brasil, 4.365 Manguinhos – Rio de Janeiro, RJ – CEP 21040-360 – Brasil
 Pavilhão Leônidas Deane, 5º andar – salas 509,502; 1º andar – sala 116
 Tel.: (0055) (21) 3865-8177 / 3865-8195 – Fax: (0055) (21) 3865-8195



CERTIFICADO DE AUTENTICAÇÃO

CA 063/2013

Solicitação nº: SC 003/2013
 Solicitante (nome e instituição): Sérgio Mendonça
 Laboratório de Imunoparasitologia
 Data da solicitação: 27/02/2013
 Data liberação da amostra: 21/06/2013

IOC-L	2483
Referência Internacional	MHOM/BR/2000/LTCP13396
Identificação	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>
Método de caracterização	<input checked="" type="checkbox"/> Isoenzimas <input type="checkbox"/> AcMonoclonais <input type="checkbox"/> PCR
Relatório de ensaio nº	
Arquivo de Caracterização MLEE:	Ano: 2013 Página nº: 12
Lote	015/2013
Quantidade	~2mL
Meio de cultura utilizado	Schneider + 20 % de Soro Fetal Bovino + 2% urina
Antibióticos usados	Penicilina + Estreptomicina
Temperatura de cultivo	25°C
Nº Passagens	Desconhecida
Infectividade	<input type="checkbox"/> Positiva <input checked="" type="checkbox"/> Desconhecida
Estado da cultura	+++

Exemplo de Referência Internacional: MHOM/BR/1975/M2903; onde M = Mamalia (classe); HOM = *Homo sapiens* (espécie); BR = Brasil (País onde foi isolada a cepa); 1975 = ano de isolamento; e M2903 = nome ou código da cepa.

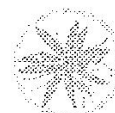
Importante: As informações apresentadas neste certificado são garantidas até o momento da saída das amostras da CLIOC.

Solicita-se a citação, na seção de metodologia, da "Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC" nos projetos científicos, teses, dissertações e artigos publicados, em função da utilização das amostras de *Leishmania* doadas por esse laboratório/coleção. Favor acessar <http://clioc.fiocruz.br>, menu SERVIÇOS, para dados completos da citação.

É expressamente vetada a doação desta amostra por outras pessoas ou instituições que não a CLIOC.


 (Nome completo) Fabiana Neves dos Santos Faissal
 (Cargo) Tecnóloga
 Laboratório de Pesquisa Leishmaniose/IOC
 FIOCRUZ - SIAPE 1635388

Av. Brasil, 4.365 Manguinhos - Rio de Janeiro, RJ - CEP 21040-360 - Brasil
 Pavilhão Leônidas Deane, 5º andar - salas 509,502, 1º andar - sala 116
 Tel.: (0055) (21) 3865-8177 / 3865-8195 - Fax: (0055) (21) 3865-8195



CERTIFICADO DE AUTENTICAÇÃO

CA 011/2013

Solicitação nº: SC 003/2013

Solicitante (nome e instituição): Sérgio Mendonça – Laboratório de Imunoparasitologia

Data da solicitação: 27/02/2013

Data liberação da amostra: 16/04/2013


IOC-L	2491
Referência Internacional	MHOM/BR/2002/NMT-RBO 005
Identificação	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>
Método de caracterização	<input checked="" type="checkbox"/> Isoenzimas <input type="checkbox"/> AcMonoclonais <input type="checkbox"/> PCR
Relatório de ensaio nº	
Arquivo de Caracterização MLEE:	Ano: 2013 Página nº: 11
Lote	023/2013
Quantidade	~2mL
Meio de cultura utilizado	Schneider + 20 % de Soro Fetal Bovino + 2% urina
Antibióticos usados	Penicilina + Estreptomicina
Temperatura de cultivo	25°C
Nº Passagens	Desconhecida
Infectividade	<input type="checkbox"/> Positiva <input checked="" type="checkbox"/> Desconhecida
Estado da cultura	+++

Exemplo de Referência Internacional: MHOM/BR/1975/M2903; onde M = Mammalia (classe); HOM = *Homo sapiens* (espécie); BR = Brasil (País onde foi isolada a cepa); 1975 = ano de isolamento; e M2903 = nome ou código da cepa.

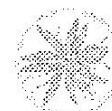
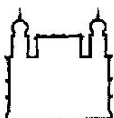
Importante: As informações apresentadas neste certificado são garantidas até o momento da saída das amostras da CLIOC.

Solicita-se a citação, na seção de metodologia, da "Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC" nos projetos científicos, teses, dissertações e artigos publicados, em função da utilização das amostras de *Leishmania* doadas por esse laboratório/coleção. Favor acessar <http://clioc.fiocruz.br>, menu SERVIÇOS, para dados completos da citação.

É expressamente vetada a doação desta amostra por outras pessoas ou instituições que não a CLIOC.


 Patrícia Neves dos Santos Fátima
 Tecnóloga
 Laboratório de Pesquisa Leishmaniose/IOC
 FIOCRUZ - SIAPE: 1635389

Av. Brasil, 4.365 Manguinhos - Rio de Janeiro, RJ - CEP 21040-360 - Brasil
 Pavilhão Leônidas Deane, 5º andar - salas 509,502; 1º andar - sala 116
 Tel.: (0055) (21) 3865-8177 / 3865-8195 - Fax: (0055) (21) 3865-8195



CERTIFICADO DE AUTENTICAÇÃO

CA 073/2013

Solicitação nº: SC 025/2013
 Solicitante (nome e instituição): Sérgio Coutinho F. de Mendonça
 Lab. de Imunoparasitologia - IOC
 Data da solicitação: 23/05/2013
 Data liberação da amostra: 05/07/2013

IOC-L	3327
Referência Internacional	MHOM/BR/2011/RSG
Identificação	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>
Método de caracterização	<input checked="" type="checkbox"/> Isoenzimas <input type="checkbox"/> AcMonoclonais <input type="checkbox"/> PCR
Relatório de ensaio nº	
Arquivo de Caracterização MLEE:	Ano: 2013 Página nº: 18
Lote	046/2013
Quantidade	~2mL
Meio de cultura utilizado	Schneider + 20 % de Soro Fetal Bovino + 2% urina
Antibióticos usados	Penicilina + Estreptomina
Temperatura de cultivo	25°C
Nº Passagens	Desconhecida
Infectividade	<input type="checkbox"/> Positiva <input checked="" type="checkbox"/> Desconhecida
Estado da cultura	+++

Exemplo de Referência Internacional: MHOM/BR/1975/M2903; onde M = Mamalia (classe); HOM = *Homo sapiens* (espécie); BR = Brasil (País onde foi isolada a cepa); 1975 = ano de isolamento; e M2903 = nome ou código da cepa.

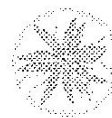
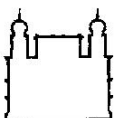
Importante: As informações apresentadas neste certificado são garantidas até o momento da saída das amostras da CLIOC.

Solicita-se a citação, na seção de metodologia, da "Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC" nos projetos científicos, teses, dissertações e artigos publicados, em função da utilização das amostras de *Leishmania* doadas por esse laboratório/coleção. Favor acessar <http://clioc.fiocruz.br>, menu SERVIÇOS, para dados completos da citação.

É expressamente vetada a doação desta amostra por outras pessoas ou instituições que não a CLIOC.

Daniela Neves dos Santos Faleiros
 Técnico(a) de Laboratório de Pesquisa Leishmaniose/IOC
 (Nome e sobrenome)
 FIOCRUZ - SAPE 1635388
 (Cargo)

Av. Brasil, 4.365 Manguinhos - Rio de Janeiro, RJ - CEP 21040-360 - Brasil
 Pavilhão Leônidas Deane, 5º andar - salas 509,502; 1º andar - sala 116
 Tel.: (0055) (21) 3865-8177 / 3865-8195 - Fax: (0055) (21) 3865-8195



CERTIFICADO DE AUTENTICAÇÃO

CA 072/2013

Solicitação nº: SC 025/2013

Solicitante (nome e instituição): Sérgio Coutinho F. de Mendonça
Lab. de Imunoparasitologia - IOC

Data da solicitação: 23/05/2013

Data liberação da amostra: 05/07/2013

IOC-L	3308
Referência Internacional	MHOM/BR/2010/S29
Identificação	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>
Método de caracterização	<input checked="" type="checkbox"/> Isoenzimas <input type="checkbox"/> AcMonoclonais <input type="checkbox"/> PCR
Relatório de ensaio nº	
Arquivo de Caracterização MLEE:	Ano: 2013 Página nº: 19
Lote	040/2013
Quantidade	~2mL
Meio de cultura utilizado	Schneider + 20 % de Soro Fetal Bovino + 2% urina
Antibióticos usados	Penicilina + Estreptomicina
Temperatura de cultivo	25°C
Nº Passagens	Desconhecida
Infectividade	<input type="checkbox"/> Positiva <input checked="" type="checkbox"/> Desconhecida
Estado da cultura	+++

Exemplo de Referência Internacional: MHOM/BR/1975/M2903; onde M = Mamalia (classe); HOM = *Homo sapiens* (espécie); BR = Brasil (País onde foi isolada a cepa); 1975 = ano de isolamento; e M2903 = nome ou código da cepa.

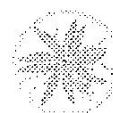
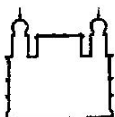
Importante: As informações apresentadas neste certificado são garantidas até o momento da saída das amostras da CLIOC.

Solicita-se a citação, na seção de metodologia, da "Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC" nos projetos científicos, teses, dissertações e artigos publicados, em função da utilização das amostras de *Leishmania* doadas por esse laboratório/coleção. Favor acessar <http://clioc.fiocruz.br>, menu SERVIÇOS, para dados completos da citação.

É expressamente vetada a doação desta amostra por outras pessoas ou instituições que não a CLIOC.


Barbara Neves dos Santos Falssal
Tecnologista
Laboratório de Pesquisa Leishmaniose/IOC
Fiocruz - SIAPE 1635388

Av. Brasil, 4.365 Manguinhos - Rio de Janeiro, RJ - CEP 21040-360 - Brasil
Pavilhão Leônidas Deane, 5º andar - salas 509,502; 1º andar - sala 116
Tel.: (0055) (21) 3865-8177 / 3865-8195 - Fax: (0055) (21) 3865-8195



CERTIFICADO DE AUTENTICAÇÃO

CA 074/2013

Solicitação nº: SC 025/2013

Solicitante (nome e instituição): Sérgio Coutinho F. de Mendonça
 Lab. de Imunoparasitologia - IOC

Data da solicitação: 23/05/2013

Data liberação da amostra: 05/07/2013

IOC-L	3232
Referência Internacional	MHOM/BR/2010/LMA
Identificação	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>
Método de caracterização	<input checked="" type="checkbox"/> Isoenzimas <input type="checkbox"/> AcMonoclonais <input type="checkbox"/> PCR
Relatório de ensaio nº	
Arquivo de Caracterização MLEE:	Ano: 2013 Página nº: 19
Lote	046/2013
Quantidade	~2mL
Meio de cultura utilizado	Schneider + 20 % de Soro Fetal Bovino + 2% urina
Antibióticos usados	Penicilina + Estreptomicina
Temperatura de cultivo	25°C
Nº Passagens	Desconhecida
Infectividade	<input type="checkbox"/> Positiva <input checked="" type="checkbox"/> Desconhecida
Estado da cultura	+++

Exemplo de Referência Internacional: MHOM/BR/1975/M2903; onde M = Mamalia (classe); HOM = *Homo sapiens* (espécie); BR = Brasil (País onde foi isolada a cepa); 1975 = ano de isolamento; e M2903 = nome ou código da cepa.

importante: As informações apresentadas neste certificado são garantidas até o momento da saída das amostras da CLIOC.

Solicita-se a citação, na seção de metodologia, da "Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC" nos projetos científicos, teses, dissertações e artigos publicados, em função da utilização das amostras de *Leishmania* doadas por esse laboratório/coleção. Favor acessar <http://clioc.fiocruz.br>, menu SERVIÇOS, para dados completos da citação.

É expressamente vetada a doação desta amostra por outras pessoas ou instituições que não a CLIOC.


 (Nome completo) _____
 (Cargo) _____
 Laboratório de Pesquisa Leishmaniose/IOC
 FIOCRUZ - SIAPE 1635388

Av. Brasil, 4.365 Manguinhos - Rio de Janeiro, RJ - CEP 21040-360 - Brasil
 Pavilhão Leônidas Deane, 5º andar - salas 509,502; 1º andar - sala 116
 Tel.: (0055) (21) 3865-8177 / 3865-8195 - Fax: (0055) (21) 3865-8195

ANEXO B – CERTIFICADO DE AUTENTICAÇÃO DA CEPA IFLA/BR/1967/PH8 EM AMOSTRAS ISOLADAS DE HAMSTER E CAMUNDONGO



Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Oswaldo Cruz
 Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose
 Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz
 Laboratório de Referência Nacional para Tipagem de Leishmania
 Av. Brasil, 4365, Pavilhão Leonidas Deane, salas 116 / 502 / 502-A / 509 / 509-A
 CEP: 21040-360 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
 Tel.: 55(21) 3865-8195/3865-8172/3865-8226, Fax.: 55(21) 3865-8195



RELATÓRIO DE ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE LEISHMANIA POR ELETROFORESE DE ENZIMAS

Solicitação (s) nº: 066/2013

RE 009/2014

Solicitante: Sergio Coutinho Furtado de Mendonça

Instituição: Instituto Oswaldo Cruz

Endereço Completo: Av Brasil 4365, Manginhos, Pav Leonidas Deane, 4 andar

Data da entrada da amostra: 11/11/2013

Data da liberação do resultado: 25/03/2014

Amostra	Ordem de Entrada	Forma de recebimento	Resultado da caracterização	IOC-L
PH8 3P cdg	136/2013	cultura	<i>L. amazonensis</i>	
PH8 1P hamster	139/2013	cultura	<i>L. amazonensis</i>	
---		---	---	
---		---	---	
---		---	---	
---		---	---	
---		---	---	
---		---	---	
---		---	---	

Obs: ---

Enzimas ensaiadas:

<input type="checkbox"/> ME	<input type="checkbox"/> MDH	<input type="checkbox"/> ACP	<input checked="" type="checkbox"/> G6PDH	<input type="checkbox"/> PGM	<input checked="" type="checkbox"/> 6PGDH	<input type="checkbox"/> GPI	<input type="checkbox"/> FUM	<input type="checkbox"/> MPI
<input type="checkbox"/> IDH	<input type="checkbox"/> IDH	<input type="checkbox"/> PEPD	<input type="checkbox"/> PEPD2	<input type="checkbox"/> PEPD3	<input type="checkbox"/> ACON	<input type="checkbox"/> HK	<input type="checkbox"/> NH	
<input checked="" type="checkbox"/> NADP	<input type="checkbox"/> NAD							

Método utilizado: MLEE (multilocus enzyme electrophoresis) segundo protocolo descrito em Cupóllio et al 1994. Am. J. Trop. Med. Hyg.

Registro do ensaio:

Arquivo de ensaio Isoenzimático: 42/2013

Solicita-se a citação, na seção de metodologia, da "Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz – CLIOC" nos projetos científicos, teses, dissertações e artigos publicados, em função da utilização das amostras de *Leishmania* doadas por esse laboratório/coleção. Favor acessar <http://clioc.fiocruz.br>, menu SERVIÇOS, para dados completos da citação.

A CLIOC informa que a amostragem enviada e a veracidade das informações associadas são de total responsabilidade do depositante/cliente.

Responsável LRNTU/CLIOC

Rio de Janeiro, 26 de março de 2014

APÊNDICE A – OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NO PCR MULTIPLEX EM TEMPO REAL

Oligonucleotídeos utilizados no ensaio de PCR Multiplex em tempo real, com suas respectivas sequências e importância pela qual foram adicionados no presente estudo. Os genes em negrito são os constitutivos utilizados para a normalização dos ensaios.

Gene	Fita	Sequência (5'-3')	Importância no trabalho
IL-1 α	Senso	TCGGCAAAGAAATCAAGATGGC	Resposta imune de <i>Leishmania</i> sp.
	Antisenso	CTGATACTGTCACCCGGCTC	
IL-1 β	Senso	AGCTTCCTTGTGCAAGTGTCT	Resposta imune de <i>Leishmania</i> sp.
	Antisenso	GACAGCCCAGGTCAAAGGTT	
IL-6	Senso	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	Resposta imune de <i>Leishmania</i> sp.
	Antisenso	TCACAGCCTACCCACCTCTT	
IL-15	Senso	CCAGTTGCAGAGTTGGACGA	Resposta imune de <i>Leishmania</i> sp.
	Antisenso	CAAGGTGGATTCTTTCCTGACCT	
IL-18	Senso	TGAACCCAGACCAGACTGA	Resposta imune de <i>Leishmania</i> sp.
	Antisenso	TTCAGGTGGATCCATTTCTCA	
G-CSF	Senso	CCCACCTTGGACTTGCTTCA	Resposta imune de <i>Leishmania</i> sp.
	Antisenso	TAGGTTTTCCATCTGCTGCCA	
GM-CSF	Senso	CAGGGTCTACGGGGCAATTT	Resposta imune de <i>Leishmania</i> sp.
	Antisenso	GTCCGTTTCCGGAGTTGGG	
TGF- β	Senso	GAAGGACCTGGGTTGGAAGT	Resposta imune de <i>Leishmania</i> sp.
	Antisenso	GGGTTGTAGAGGGCAAGGAC	
NOS	Senso	TCAGGTGCCCTCTAGCACTT	Síntese de óxido nítrico
	Antisenso	CTGAGGCGACAGAAGGTAGG	
TLR4	Senso	TCAGCACTACATCGCCTGAC	Resposta imune inata
	Antisenso	GTCAGCTCCACTTTGCATCA	
TLR9	Senso	CCTGGCTCTCACAGGTTCTC	Resposta imune inata
	Antisenso	GCTTCAGCTCACAGGGTAGG	