



**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Mestrado em Biologia Parasitária



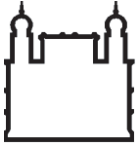
**SUSCETIBILIDADE vs RESISTÊNCIA: ESTUDO DA  
INFEÇÃO POR *Leishmania (Leishmania) amazonensis* EM  
MACRÓFAGOS MURINOS**

*SANDY SANTOS PEREIRA*



**RIO DE JANEIRO – RJ**

**Março/2015**



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

SANDY SANTOS PEREIRA

**SUSCETIBILIDADE vs RESISTÊNCIA: ESTUDO DA  
INFECÇÃO POR *Leishmania (Leishmania) amazonensis* EM  
MACRÓFAGOS MURINOS**

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

**Orientadora:** Dra. TÂNIA ZAVERUCHA DO VALLE

**RIO DE JANEIRO – RJ**

**Março/2015**

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

P436 Pereira, Sandy Santos

Suscetibilidade vs resistência: estudo da infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em macrófagos murinos / Sandy Santos Pereira. – Rio de Janeiro, 2015.  
xiii,96 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.  
Bibliografia: f. 94-109

1. *Leishmania amazonensis*. 2. Macrófagos. 3. Genética do hospedeiro. 4. Resistência/suscetibilidade. 5. Óxido nítrico. 6. Camundongo C3H/He. I. Título.

CDD 616.9364



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Parasitária de **Sandy Santos Pereira**, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Tânia Zaverucha do Valle. Ao vigésimo quinto dia do mês de março de dois mil e quinze, realizou-se às quatorze horas, no Auditório Emmanuel Dias/FIOCRUZ, o exame da dissertação de mestrado intitulada: **"Suscetibilidade vs Resistência: Estudo da infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em macrófagos murinos"** no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Ciências - área de concentração: Biologia, na linha de pesquisa: Biologia de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Paula Mello De Luca - IOC/Fiocruz (Presidente), Dr. Adriano Gomes da Silva - INI/Fiocruz, Dr<sup>a</sup>. Elaine Soares Coimbra - UFJF/MG e como suplentes: Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral - IOC/Fiocruz e Dr. Igor de Almeida Rodrigues - UFRJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela Aprovação da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestra em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 25 de março de 2015.

Dr<sup>a</sup>. Paula Mello De Luca (Presidente da Banca):

Dr. Adriano Gomes da Silva (Membro da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Elaine Soares Coimbra (Membro da Banca):

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

Dedico esta dissertação aos meus pais, irmão, Eder e amigos que tanto contribuíram para minha formação.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por permitir a minha vinda a este mundo em uma família espetacular, por iluminar minhas decisões e proteger a todos que amo.

Agradeço a meus pais por todo afeto, carinho, amor, incentivo em todas as minhas escolhas e etapas da vida. A meu pai Odair, por me mostrar que o conhecimento é um dos bens mais valiosos que ele pode deixar para mim e que ninguém poderá tirar. A minha querida mãe, Vania Maria, pela abnegação à mim e ao meu irmão, por toda força e amor a nós dedicados, por ser a base de nossa família, pois sem você nada seríamos!

Ao meu irmão Renan, que sempre me apoiou, incentivou, acolheu e me fez sorrir nos momentos ruins. Por sempre me por em primeiro lugar. Obrigado por seu amor e pela minha sobrinha Lívia!

Ao Eder, meu companheiro para o todo e sempre, por me acompanhar e incentivar em minhas batalhas, pela sua simplicidade, e por me amar do jeito que sou!

Às minhas amigas Elaine Rodrigues, Jessica Meireles e Josy Marques pelo total apoio e amizade!

À minha orientadora Tânia Zaverucha, pela magnífica orientação, sutileza, paciência, compreensão, dedicação e apoio de todas as maneiras possíveis para meu crescimento ao longo desses 5 anos. Muito obrigada!

À Celeste Freitas, Kátia Calabrese, Luiz d'Scoffier e Luiz Otávio por estarem sempre dispostos a ajudar, e em especial a Celeste por ter me chamado para estagiar no laboratório e me indicado à Tânia.

Aos meus amigos de laboratório: Carolina Salles, Caroline Magalhães, Daiana Haroim, Fernando Almeida, Flávia Cardoso, Henrique Previtalli, Liliane Willi, e Mariana Rottini pela ajuda nos momentos de dúvidas, pelos momentos de descontração nos dias de intenso trabalho, pelo incentivo, pelas conversas fiadas e pela amizade!

À Thaís Peçanha e Letícia Feliciano, pela ajuda e incentivo na fase final do trabalho. Em especial a Thaís, por ter me ouvido nos meus momentos de desespero, alucinações, por toda amizade, força (e pressão psicológica) oferecida!

Aos meus amigos da turma de mestrado, em especial a Amanda Tucci, Cíntia Mello, Juliana Guimarães e Mayara Mendes, por compartilharem momentos de extremo estresse nas disciplinas, pelas conversas, pelas risadas e apoio em todas as etapas. Essa turma foi perfeita!

À Edna e ao Bruno por atenderem meus pedidos de esterilização de última hora.

Agradeço a todos os animais utilizados neste trabalho, que assim permitiram a aquisição de conhecimento por mim e a diversas pessoas que poderão vir a ler este trabalho.

À Dra. Paula Mello de Luca pela valiosa e dedicada revisão ao meu trabalho. E aos membros da banca, Dr. Adriano G. da Silva e Dra Elaine S. Coimbra por aceitarem o convite, se prontificando a contribuir para mais um passo da minha formação profissional.

E agradeço também as diversas pessoas que cruzaram meu caminho e contribuíram de diferentes formas em meu crescimento moral e profissional, e as que sempre torcem e oram por mim e pela minha família. Obrigada!

“Tem dias que a gente se sente, como quem partiu ou morreu. A gente estancou de repente, ou foi o mundo então que cresceu. A gente quer ter voz ativa, no nosso destino mandar. Mas eis que chega a roda-viva e carrega o destino pra lá.”

Roda Viva – Chico Buarque



## RESUMO

Os macrófagos são um dos principais fagócitos do sistema imunológico atuando tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa. Na infecção por *Leishmania* são as principais células infectadas nos hospedeiros vertebrados, tendo, portanto, a função de controlar ou favorecer a proliferação do parasito. Diferentes espécies do parasito produzem diferentes manifestações clínicas, mas o perfil genético assim como a resposta imunológica do hospedeiro pode modular o desenvolvimento da doença. Para melhor compreensão da biologia das leishmanioses, utilizam-se modelos de infecção experimental em camundongos como ferramenta para estudo da imunologia, resistência e suscetibilidade ao parasito. Neste trabalho estudamos a infecção por *Leishmania amazonensis* em macrófagos de três linhagens de camundongos com diferentes graus de suscetibilidade ao parasito. Para isso macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, C57BL/10 e C3H/He foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* para avaliação da multiplicação de amastigotas intracelulares, produção de óxido nítrico (NO) e produção de citocinas. Macrófagos de C3H/He infectados por 2 MOI de *L. amazonensis* apresentaram número de amastigotas e taxa de infecção similares a células de BALB/c e C57BL/10 nas primeiras 48h de infecção. No entanto, a partir de 72 horas a taxa de infecção e número total de amastigotas foi menor quando comparadas com células de origem BALB/c. Quando as células foram estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$ , a carga parasitária dos macrófagos das três linhagens foram reduzidas, porém os macrófagos BALB/c permaneceram com carga parasitária maior do que os de origem C3H/He. A produção de NO pelas células infectadas só foi diferente sob estimulação, quando os macrófagos de origem BALB/c produziram menos NO do que os C3H/He e C57BL/10. A dosagem de citocinas no sobrenadante das culturas sem estímulo mostrou que os macrófagos de C3H/He apresentaram altos níveis de IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-10, sendo este último exacerbado pela infecção, quando comparados as demais linhagens. A estimulação por LPS e IFN- $\gamma$  aumentou a produção de citocinas dos macrófagos de BALB/c e C57BL/10. Já as células de origem C3H/He quando estimuladas mostraram pouca ou nenhuma produção de IL-1 $\beta$ , IL12 e IL-10 e uma estimulação moderada de TNF e IL-6. Finalmente, a inibição da iNOS pela aminoguanidina não foi capaz de diminuir a resistência dos macrófagos de C3H/He. Podemos, portanto, concluir que macrófagos de camundongos C3H/He são menos suscetíveis a infecção por *L. amazonensis*, mas essa sua resistência não é dependente da produção de óxido nítrico e nem de uma resposta do tipo Th1.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*, genética do hospedeiro, resistência/suscetibilidade, óxido nítrico, macrófagos, camundongo C3H/He.

## ABSTRACT

Macrophages are the main phagocytes of the immune system, participating on the innate and adaptive responses. They are the main host cell during *Leishmania* infection, participating on the control or multiplication of the parasite. Different species of the parasite produce different clinical manifestations, but the genetic background and the immune response of the host may modulate the development of the disease. In order to understand the biology of the leishmaniasis the mouse experimental model is used as a tool for the study of immunology and resistance/susceptibility to the parasite. In this work we have studied *Leishmania amazonensis* infection in macrophages obtained from three different inbred mouse strains, presenting different degrees of susceptibility to infection. Therefore, peritoneal macrophages of BALB/c, C57BL/10 and C3H/He mice were infected with *L. amazonensis* promastigotes in order to evaluate the number of intracellular amastigotes and infection rate. C3H/He macrophages infected with 2 MOI of *L. amazonensis* presented similar number of amastigotes and infection rate as BALB/c and C57BL/10 cells on the first 48 hours after infection. However, after 72 hours infection rate and number of amastigotes per cells were higher in BALB/c cells. When cells were stimulated with LPS and IFN- $\gamma$ , parasite load of all three inbred strains was reduced, but macrophages from BALB/c remained with a higher parasite load than C3H/He. Nitric oxide production by infected macrophages was only different under stimulation, when macrophages from BALB/c produced less NO than C3H/He and C57BL/10. Cytokine dosage of culture supernatants showed that all non-stimulated cultures produced of macrophages from C3H/He produced high levels of IFN- $\gamma$ , IL-12 and IL-10, the later being further exacerbated by infection, when compared with the others strains. Stimulation by LPS and IFN- $\gamma$  enhanced cytokine production by BALB/c and C57BL/10 macrophages. C3H/He cells when stimulated showed low or no production of IL-1  $\beta$ , IL-12 and IL-10 and a moderate enhancement of TNF and IL-6. Finally, iNOS inhibition by aminoguanidine was not able to reduce the resistance of C3H/He macrophages. We can then conclude that macrophages from C3H/He are less susceptible to *L. amazonensis* infection, but resistance is not dependent on nitric oxide production of a Th1 response.

Keywords: *Leishmania amazonensis*, host genetics, resistance/susceptibility, nitric oxide, macrophages, C3H/He mice.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>14</b>
1.1. A <i>Leishmania</i> .....	15
1.1.2. Ciclo Biológico .....	16
1.2. Epidemiologia .....	19
1.3. Leishmaniose Tegumentar .....	20
1.4. Macrófago x <i>Leishmania</i> .....	23
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>36</b>
2.1. Objetivo geral.....	37
2.2. Objetivos específicos .....	37
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	<b>38</b>
3.1. Animais .....	39
3.2. Parasito .....	39
3.2.1. Caracterização do parasito .....	39
3.2.2. Cultivo e manutenção do parasito .....	39
3.3. Obtenção de macrófagos peritoneais .....	40
3.4. Infecção de macrófagos peritoneais .....	41
3.5. Desenho experimental .....	41
3.5.1. Protocolos sem estímulo .....	42
3.5.2. Protocolos com estímulos de LPS e IFN- $\gamma$ .....	42
3.5.3. Protocolos de inibição da iNOS .....	43
3.6. Avaliação da carga parasitária intracelular e taxa de infecção de macrófagos .....	43
3.7. Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) .....	44
3.8. Dosagem de citocinas.....	44
<b>4. Resultados</b> .....	<b>46</b>
4.1. Padronização concentração de células e infecção .....	47
4.2. Protocolos sem estímulo .....	47
4.2.1. Avaliação da carga parasitária intracelular e taxa de infecção de macrófagos.....	47
4.2.2. Avaliação da produção de óxido nítrico (NO).....	47
4.2.3. Dosagem de citocinas.....	48
4.3. Padronização do LPS.....	60
4.4. Padronização do IFN- $\gamma$ .....	60
4.5. Protocolos com estímulo.....	60

4.5.1. Avaliação da carga parasitária intracelular e taxa de infecção de macrófagos.....	60
4.5.2. Avaliação da produção de óxido nítrico.....	61
4.5.3. Dosagem de citocinas.....	61
4.6. Padronização aminoguanidina.....	73
4.7. Protocolos de inibição da iNOS.....	73
4.7.1. Avaliação da carga parasitária intracelular e da taxa de infecção dos macrófagos .....	73
<b>5. Discussão .....</b>	<b>77</b>
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>92</b>
<b>7. Referências bibliográficas .....</b>	<b>94</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Distribuição da Leishmaniose Tegumentar.....	20
FIGURA 4.1 - Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados por <i>L. amazonensis</i> .....	50
FIGURA 4.2 - Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/10 infectados por <i>L. amazonensis</i> .....	51
FIGURA 4.3 - Macrófagos peritoneais de camundongos C3H/He infectados por <i>L. amazonensis</i> .....	52
FIGURA 4.4 - Contagem de amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais infectados por <i>L. amazonensis</i> .....	53
FIGURA 4.5 - Dosagem de nitrito em macrófagos peritoneais infectados ou não por <i>L. amazonensis</i> .....	54
FIGURA 4.6 - Produção de IFN- $\gamma$ por macrófagos peritoneais infectados ou não por <i>L. amazonensis</i> .....	55
FIGURA 4.7 - Produção de IL-1 $\beta$ por macrófagos peritoneais infectados ou não por <i>L. amazonensis</i> .....	56
FIGURA 4.8 - Produção de IL-12 por macrófagos peritoneais infectados ou não por <i>L. amazonensis</i> .....	57
FIGURA 4.9 - Produção de TNF- $\alpha$ por macrófagos peritoneais infectados ou não por <i>L. amazonensis</i> .....	58
FIGURA 4.10 - Produção de IL-10 por macrófagos peritoneais infectados ou não por <i>L. amazonensis</i> .....	59
FIGURA 4.11 - Padronização da concentração de LPS.....	63
FIGURA 4.12 - Padronização da concentração do IFN- $\gamma$ .....	64
FIGURA 4.13 - Contagem amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais infectados por <i>L. amazonensis</i> e estimulados por LPS e IFN- $\gamma$ .....	65
FIGURA 4.14 - Dosagem de nitrito em macrófagos peritoneais estimulados infectados ou não por <i>L. amazonensis</i> por IFN- $\gamma$ e LPS.....	66
FIGURA 4.15 - Dosagem de nitrito em macrófagos peritoneais infectados por ou não <i>L. amazonensis</i> estimulados por IFN- $\gamma$ e LPS.....	67
FIGURA 4.16 - Produção de IL-1 $\beta$ por macrófagos peritoneais estimulados por IFN- $\gamma$ e LPS infectados ou por <i>L. amazonensis</i> .....	68
FIGURA 4.17 - Produção de IL-12 por macrófagos peritoneais infectados ou não por <i>L. amazonensis</i> .estimulados por IFN- $\gamma$ e LPS.....	69

FIGURA 4.18 - Produção de TNF- $\alpha$ por macrófagos peritoneais infectados ou por <i>L. amazonensis</i> estimulados por IFN- $\gamma$ e LPS.....	70
FIGURA 4.19 - Produção de IL-10 por macrófagos peritoneais infectados ou não por <i>L. amazonensis</i> estimulados por IFN- $\gamma$ e LPS.....	71
FIGURA 4.20 - Produção de IL-6 por macrófagos peritoneais infectados ou não por <i>L. amazonensis</i> estimulados por IFN- $\gamma$ e LPS.....	72
FIGURA 4.21 - Padronização da concentração aminoguanidina.....	74
FIGURA 4.22 - Contagem de amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais infectados por <i>L. amazonensis</i> tratados com aminoguanidina.....	75
FIGURA 4.23 - Contagem de amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais infectados por <i>L. amazonensis</i> tratados ou não com aminoguanidina.....	76

## **1. INTRODUÇÃO**

---

### 1.1. A *Leishmania*

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que afetam homens e animais, ocasionadas por diferentes espécies de protozoários heteroxênicos do gênero *Leishmania* (Gontijo; Carvalho, 2003; Neves et al, 2011). Atualmente, são conhecidas mais de 20 espécies de *Leishmania* que estão distribuídas mundialmente (McGwire; Satoskar, 2014). Estes parasitos apresentam a seguinte classificação taxonômica (Gontijo; Carvalho, 2003; Neves et al, 2011):

Reino: **Protozoa** (Goldfuss, 1817)

Filo: **Sarcomastigophora** (Honigberg e Baçamuth, 1963)

- Sub-filo: **Mastigophora** (Desing, 1866)

Classe: **Zoomastigophora** (Calkins, 1909)

Ordem: **Kinetoplastida** (Honinberg, 1963, emend. Vickerman, 1976)

- Subordem: **Trypanosamatina** (Kent, 1880)

Família: **Trypanosomatidae** (Dolfein, 1901)

Gênero: ***Leishmania*** (Ross, 1903)

-Subgênero: ***Leishmania*** (Ross, 1903)

-Subgênero: ***Viannia*** (Lainson; Shaw, 1987)

Os subgêneros criados levam em consideração as características de desenvolvimento dos parasitos nos insetos vetores. Os parasitos do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se no intestino médio e posterior dos flebotomíneos, e os do gênero *Viannia* desenvolvem-se na região média e anterior do intestino destes insetos (Lainson; Shaw, 1987 apud Grossage et al, 2003; Lainson, 2010). A seguir, estão listadas as espécies que fazem parte dos subgêneros:



Subgênero <i>Leishmania</i> (Saf' Janova 1982)	Subgênero <i>Viannia</i> (Lainson & Shaw, 1987)
<i>L. (Leishmania) donovani</i>	<i>L. (Viannia) braziliensis</i>
<i>L. (L.) infantum infantum</i>	<i>L. (V.) guyanensis</i>
<i>L. (L.) archibaldi</i>	<i>L. (V.) panamensis</i>
<i>L. (L.) tropica</i>	<i>L. (V.) peruviana</i>
<i>L. (L.) major</i>	<i>L. (V.) lainsoni</i>
<i>L. (L.) gerbilli#</i>	<i>L. (V.) naiffi</i>
<i>L. (L.) mexicana</i>	<i>L. (V.) shawi</i>
<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) colombiensis</i>
<i>L. (L.) venezuelensis</i>	<i>L. (V.) equatorensis</i>
<i>L. (L.) enriettii #</i>	<i>L. (V.) lindenberg</i>
<i>L. (L.) aristidesi</i>	<i>L. (V.) utingensis</i>
<i>L. (L.) pifanoi</i>	
<i>L. (L.) garnhami</i>	
<i>L. (L.) hertigi #</i>	
<i>L. (L.) deanei</i>	
<i>L. (L.) forattinii</i>	
<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	

Fonte: Lainson, 2010 ; # Espécies encontradas exclusivamente em animais

### 1.1.2 Ciclo Biológico

A *Leishmania* apresenta-se sob duas formas evolutivas principais: a promastigota e amastigota. A forma promastigota é extracelular, delgada, com corpo celular medindo 5 a 20 x 1 a 4µm, flagelo externo, cinetoplasto anterior ao núcleo, sendo encontrada no trato digestivo do vetor. Já a forma amastigota é intracelular, arredondada, mede cerca de 3 x 5 µm, com flagelo que está restrito a bolsa flagelar, sendo apenas visto por microscopia eletrônica. São encontradas no hospedeiro vertebrado no interior de células do sistema monocítico fagocitário, principalmente macrófagos (Ueda-Nakamura et al, 2001; Vannier-Santos et al, 2002; Gontijo;Carvalho, 2003; Rath et al, 2003; Basano; Camargo, 2004). Os vetores da *Leishmania sp.* são insetos da ordem Diptera,

**Pereira, SS**

## Introdução

---

família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomya* (no Novo Mundo) e *Phlebotomus* (no Velho Mundo) (Rath et al, 2003; Basano; Camargo, 2004). São pequenos, em torno de 2-3mm (Hepburn, 2000), pernas longas e delgadas, o corpo piloso, geralmente de cor parda, (Basano; Camargo, 2004) e possuem hábitos crepusculares e noturnos (Hepburn, 2000), abrigando-se durante o dia em lugares escuros e úmidos (Rath et al, 2003). No Brasil, são conhecidos como mosquito-palha, tatuqueiras, birigui, cangalha, dentre outros (Basano; Camargo, 2004; Ministério da Saúde, 2013). Podem ser encontrados em tocas de animais silvestres, buracos de pau (Rath et al, 2003) e em locais de eliminação de resíduos domiciliares mal acondicionados, o que propicia o aumento de sua prevalência em perímetros domésticos (Hepburn, 2000). As fêmeas destes insetos são hematófogas, portanto são as responsáveis pela transmissão do parasito para os vertebrados (Rath et al, 2003; Basano; Camargo, 2004;).

Os animais vertebrados que participam do ciclo de vida da *Leishmania sp.* como reservatórios ou hospedeiros são os mamíferos, como as raposas, gambás, preguiças, tamanduás, lobos, guaxinins, porcos, roedores e primatas, incluindo o homem (Rath et al, 2003; McGwire; Satoskar, 2014). Na Índia, por exemplo, o homem é considerado reservatório principal (McGwire; Satoskar, 2014), mas, geralmente, é hospedeiro acidental (Gontijo; Carvalho, 2003).

Como dito anteriormente, a *Leishmania sp.* é transmitida a partir do repasto sanguíneo realizado pela fêmea do flebotomíneo. Esta realiza o repasto sanguíneo para suporte nutricional aos seus ovos (MCGwire; Satoskar, 2014). Assim, ao realizar a hematofagia em um animal infectado, pode ingerir células infectadas por amastigotas (Dostálová; Volf, 2012) ou amastigotas livres no local do repasto. Dependendo do subgênero da *Leishmania*, o desenvolvimento do parasito no trato digestório será distinto. Assim, inicialmente, parasitos do subgênero *Leishmania*, se transformam em promastigotas procíclicas no intestino médio do inseto vetor, enquanto parasitos do subgênero *Viannia* transformam-se neste estágio evolutivo na região pilórica do intestino posterior. As promastigotas procíclicas são móveis, pois possuem flagelo na extremidade anterior do corpo, mas essa motilidade é baixa, e são replicativas. Estão localizadas no interior da matriz peritrófica (Bates, 2007). Esta matriz é formada de

quitina e outras moléculas que englobam o sangue ingerido pelo inseto vetor, durante o processo de digestão (Secundino et al, 2005). Depois de alguns dias, a replicação diminui e se diferenciam em promastigotas nectomonadas. Estas são longas, migratórias, com forte motilidade, sendo, portanto, as formas que escapam da matriz peritrófica. Uma vez alcançada a válvula estomodal (separa o intestino anterior do médio), as promastigotas nectomonadas se transformam em promastigotas leptomonadas. São formas menores e replicativas, responsáveis pela secreção do gel secretor da promastigota. A presença do gel interfere no repasto sanguíneo, pois obstrui a região anterior do intestino, forçando o inseto a realizar constantes repastos (Bates, 2008), e este gel juntamente com a saliva do vetor exacerba a infecção na pele do hospedeiro (Rogers; Bates, 2007). Assim, se transformam em promastigotas metacíclicas, que são as formas infectivas do hospedeiro vertebrado. Estas ficam alojadas na região anterior do intestino do vetor até serem regurgitadas durante um novo repasto sanguíneo (Gontijo; Carvalho, 2003; Rath et al, 2003; Bates, 2007).

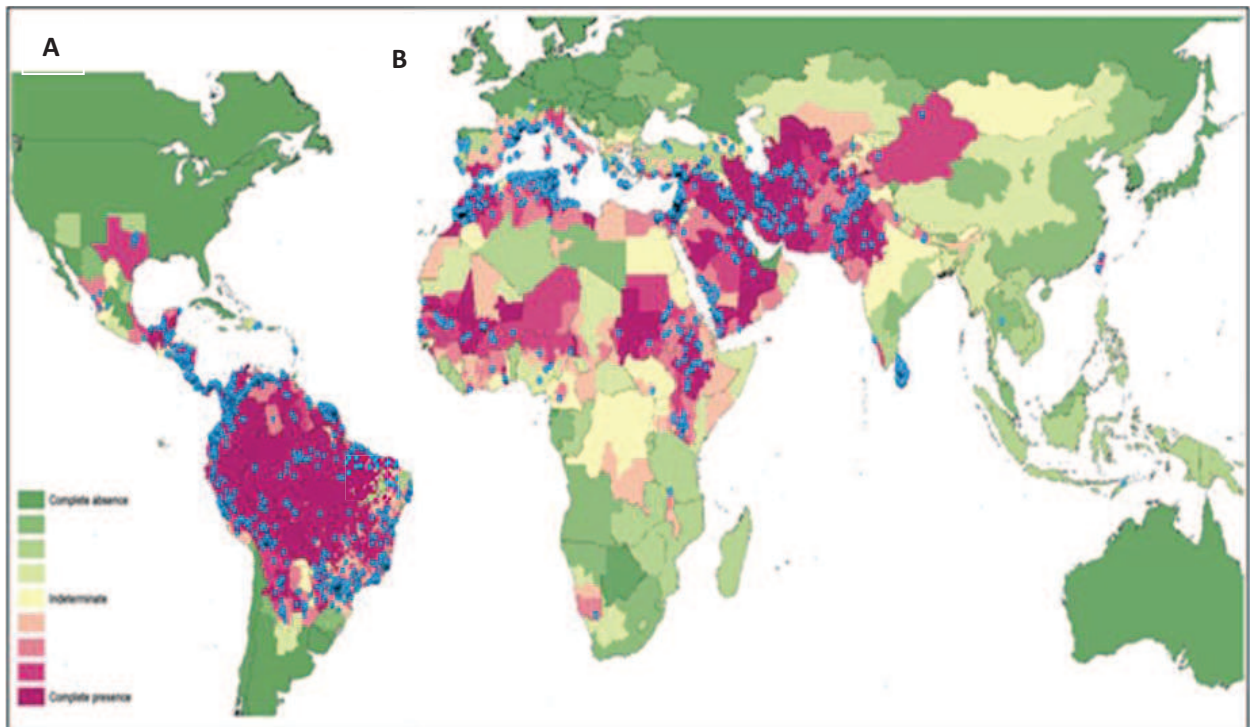
As formas promastigotas metacíclicas quando no hospedeiro vertebrado, são fagocitadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear. Uma vez no interior destas células, ficam alojadas em fagolisossomos (união do vacúolo parasitóforo com lisossomos) e transformam-se em amastigotas (Rath et al, 2003; Neves et al, 2011, McGwire; Satoskar, 2014). Estas por sua vez, sofrem replicação e, eventualmente, o aumento da carga parasitária promoverá a ruptura das células, onde as formas amastigotas ficarão livres podendo ser fagocitadas por células não infectadas (MCGwire; Satoskar, 2014). Dependendo da espécie do parasito, a multiplicação das amastigotas em macrófagos de diferentes tecidos promoverá a doença na forma cutânea, mucocutânea ou visceral (Rath et al, 2003; Goto; Lauletta Lindoso, 2012; Pace, 2014).

### 1.2 Epidemiologia

As leishmanioses se dividem em tegumentar e visceral. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), são endêmicas em mais de 98 países e territórios, sendo estimado que mais de 350 milhões de pessoas estejam sob o risco de contrair a doença. (WHO, 2014).

Existem diferentes condições que contribuem para a distribuição das leishmanioses visceral e tegumentar (Pigott et al, 2014). Nas áreas endêmicas, afetam principalmente as pessoas mais pobres, e estão associadas a condições precárias de habitação; deslocamento da população, devido à procura de melhores condições de vida; mudanças ambientais, como desmatamento, construção de barragens, sistemas de irrigação e urbanização; assim como a má nutrição, sistema imunológico suscetível e dificuldade de acesso a sistemas de saúde para tratamento (Alvar et al, 2006;).

Em relação à leishmaniose tegumentar, são estimados 0.7 a 1.3 milhões de novos casos por ano no mundo. Cerca de 95% dos casos ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Mais de 2/3 dos novos casos ocorrem em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, e Síria (WHO, 2014). Nas Américas, o Brasil e os países das sub-região Andina concentram 82,6% dos casos totais (OPAS, 2014) (Figura 1.1). No Brasil, no período de 2012, as maiores taxas de incidência (casos por 100.000 habitantes) foram nos estados: Acre (144,31), Amapá (100,06), Roraima (95,20), Mato Grosso (84,58), Rondônia (71,01), Amazonas (62,66) e Pará (50,13) (Ministério da Saúde, 2012).



**Figura 1.1.** Distribuição da leishmaniose tegumentar. **A)** Leishmaniose Tegumentar no Novo Mundo. **B)** Leishmaniose Tegumentar no Velho Mundo. A presença e ausência da doença variam do verde à púrpura, onde verde representa 100% ausente e púrpura 100 % presente. Os pontos azuis são os centros de ocorrência (figura obtida em Pigott et al 2014)

### 1.3 Leishmaniose Tegumentar

A leishmaniose tegumentar compreende formas clínicas variadas dependentes da espécie e cepa da *Leishmania* assim como da resposta imunológica do hospedeiro (Goto; Lauletta Lindoso, 2012). Assim, podemos encontrar três tipos principais de leishmaniose tegumentar: a leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose cutânea difusa (Andrade et al, 2005).

A leishmaniose cutânea localizada é a forma menos severa da doença (WHO, 2014). É caracterizada pela presença de ulcerações únicas ou múltiplas. Estas lesões são encontradas, geralmente, em regiões descobertas do corpo – mais suscetíveis a picadas - (McGwire; Satoskar, 2014) e desenvolvem-se entre 2 semanas a três meses (Goto; Lauletta Lindoso, 2012), iniciando como uma pápula eritematosa que torna-se

## Introdução

---

um nódulo, e posteriormente úlcera (Andrade et al, 2005). As úlceras são indolores, com bordas elevadas e limitadas, fundo granuloso com ou sem exsudação (Andrade et al,2005), com 0.5 a 3cm de diâmetro (Hepburn, 2000). Geralmente, estas úlceras são autorresolutivas, deixando a região hipopigmentada e com fina cicatriz (Goto; Lauletta Lindoso, 2012). É causada por *Leishmania major* e *L. tropica* no Velho Mundo e *L. mexicana*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* nas regiões da América Central e América do Sul (McGwire; Satoskar, 2014). No Brasil, pode-se adicionar a *L. laiosni*, pois há relatos de alguns casos humanos (Neves et al, 2011).

A leishmaniose mucocutânea apresenta lesões nas regiões de mucosa e cartilagens, principalmente o nariz, a faringe, a boca e a laringe (Goto; Lauletta Lindoso, 2012), apresentando, comumente, uma resposta celular e humoral exacerbada (Tapia et al, 1994) e com pouco parasito nas lesões (Ministério da Saúde, 2013). Devido a isso, promove desfigurações resultantes da inflamação crônica dos tecidos das mucosas, e com o desenvolver da infecção pode afetar a respiração e a nutrição (McGwire; Satoskar, 2014). Geralmente, ocorre meses ou anos após a cutânea localizada, mas, também, pode ocorrer simultaneamente a esta forma da doença (Goto; Lauletta Lindoso, 2012). No Novo mundo, a maioria dos casos são ocasionados pela infecção por *L. braziliensis* (Neves et al, 2011; McGwire; Satoskar, 2014), assim como no Brasil (Andrade et al, 2005), existindo alguns casos de infecção por *L. panamensi*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* (Barral et al, 1991; Guerra et al, 2011). Segundo Straluzza et al (2013), a leishmaniose mucocutanea pode também ocorrer no Velho mundo sendo causadas por espécies do complexo *L. major* ou *L. donovani*.

A leishmaniose cutânea difusa é caracterizada pela presença de lesões nodulares difusas não ulceradas pela pele, com infiltrado dérmico denso de macrófagos fortemente parasitados (Costa et al 1992; Goto; Lauletta Lindoso, 2012; Mendes Wanderley et al, 2012) sem comprometimento visceral (Costa et al, 1992). A ativação deficiente dos macrófagos falha na eliminação do parasito resultando em um processo de inflamação desorganizada, que não consegue controlar a infecção (Mendes Wanderley et al, 2012). Isso ocorre devido à ausência da resposta celular do paciente em relação aos antígenos da *Leishmania*, levando ao estado de anergia imunológica contra a infecção (Neves et al, 2011; Goto; Lauletta Lindoso, 2012). Não

## Introdução

---

esta elucidada ainda a causa da anergia e da ausência de uma resposta celular. Acredita-se que pode estar associado à produção de citocinas e expressão de moléculas coestimulatórias por monócitos quando interagem com os antígenos da *Leishmania* (Carrada et al, 2007). Assim, a doença é crônica e progressiva, não respondendo a tratamentos convencionais (Silveira et al, 2004), com intradermoreação de Montenegro negativa (Costa et al, 1992). No velho mundo, a principal espécie que desenvolve esse tipo de afecção é a *L. aethiopica* e no Novo Mundo são: *L. mexicana*, *L. pifanoi* e *L. amazonensis* (Neves et al, 2011; Goto; Lauletta Lindoso, 2012). A *L. amazonensis* é a principal causadora de leishmaniose cutânea difusa no Brasil. Também há alguns casos raros de leishmaniose visceral atribuídos a essa espécie (Barral et al, 1986). Este agente etiológico é amplamente distribuído no Brasil na região da Amazônia Legal, principalmente em áreas de florestas primárias e secundárias, e na Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Paraná (Moraes; Silveira, 1994; Ministério da Saúde, 2013), sendo também encontrado no Paraguai, Colômbia, Bolívia e Guiana Francesa (Basano; Camargo, 2004). Estas regiões de florestas são perfeitos criadores para seus vetores *Lutzomia flaviscutellata* (Moraes; Silveira, 1994; Gontijo; Carvalho, 2003, Ministério da Saúde, 2013), sendo este o vetor primário (Neves et al, 2011), *Lu.olmea* (Gontijo; Carvalho, 2003; Ministério da Saúde, 2013) e *Lu. reducta* (Ministério da Saúde, 2013). Estes são pouco antropofílicos e possuem hábitos noturnos, portanto justificando a baixa frequência de infecção em homens por essa espécie de *Leishmania*. Os principais reservatórios da *L. amazonensis* são roedores silvestres do gênero *Proechymis* e o *Oryzomys* (Ministério da Saúde, 2013). Além de outros roedores: *Neacomys sp.*, *Nectomys sp.*, *Dasyprocta sp.*; e os marsupiais *Metachirus sp.*, *Philander sp.*, *Didelphis sp.*, e *Marmosa sp.*; e a raposa *Cerdocyon thous* (Basano; Camargo, 2004)

O tratamento recomendado para a leishmaniose tegumentar em primeira escolha é a utilização de antimoniais pentavalentes. Caso os pacientes não respondam ao tratamento de primeira escolha, as drogas de segunda escolha são a anfotericina B e as pentamidinas. As doses do medicamento são calculadas de acordo com o peso do paciente/dias de tratamento. É recomendável o repouso físico e abstinência de bebidas

alcoólicas durante este período (Ministério da Saúde, 2013). No entanto, o tratamento apresenta algumas dificuldades como, ocasionar graves efeitos secundários tóxicos (hepatopatia, insuficiência renal aguda, náuseas, anorexia, vômito dentre outros), a via de administração ser parenteral, o período prolongado do tratamento que favorecem a descontinuação do mesmo, além da crescente resistência do parasito as drogas. Assim vem sendo necessário avanços no conhecimento sobre a infecção por *Leishmania*, a patogênese da doença e a resposta imunológica gerada, para assim fomentar a geração de tratamentos alternativos para melhora do bem-estar dos pacientes, e o desenvolvimento e implementação de uma vacina eficaz (Cunningham, 2002; Ministério da Saúde, 2013; Kumar; Engwerda, 2014; Rottini et al, 2015).

### 1.4 Macrófagos x *Leishmania*

Os macrófagos são um dos principais fagócitos do sistema imunológico (Abbas et al, 2011). Estes são encontrados em todos os tecidos do organismo, embora com diferentes funções e fenótipos, como, por exemplo, a célula de Kupffer, que são os macrófagos presentes no fígado (Kaye; Scott, 2011). Podem apresentar diferentes funções com: fagocitose de células apoptóticas e patógenos, apresentação de antígenos aos linfócitos, produção de moléculas efetoras, como por exemplo, citocinas; assim como regulação do metabolismo de lipídeos, do ferro, cicatrização dentre outras (Classen et al, 2009; Abbas et al, 2011; Muraille et al, 2014). Assim, atuam tanto na resposta imunológica inata quanto na adaptativa (Classen et al, 2009).

Diferentes tipos de citocinas, que podem atuar de diferentes formas nas respostas imunológicas, são produzidas por macrófagos ativos. Estes produzem as citocinas IL-1, IL-6, IL-12, IL-10, IL-15, IL-18, IL-23, IL-27, TNF e o TGF- $\beta$  (Abbas et al, 2011). Além de citocinas, produzem quimiocinas (CXCL1, CXCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10 e CXCL11), prostaglandinas, leucotrienos e complemento (Arango Duque; Descoteaux, 2014).

As citocinas IL-1, IL-6 e TNF são as principais citocinas pró-inflamatórias do sistema imunológico inato. A IL-1 é um mediador de resposta inflamatória existente sob as formas: a IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1Ra, sendo a IL-1 $\beta$  a principal forma ativa secretada por



## Introdução

---

macrófagos (Abbas et al, 2011; Arango Duque; Descoteaux, 2014). Ela ativa células endoteliais; age sobre o hipotálamo secretando prostaglandinas e ocasionando a febre e age sobre o fígado levando-o a sintetizar proteínas da fase aguda (Ben-Sasson et al, 2009). Pode ser secretada principalmente quando as células infectadas ou macrófagos ativados entram em processo de autofagia (Arango Duque; Descoteaux, 2014). Também possui a função quimioatrativa para granulócitos, aumentando a proliferação e diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> e, o aumento da expressão de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais (Arango Duque; Descoteaux, 2014). O TNF ou TNF- $\alpha$  é um mediador de resposta inflamatória aguda (Beutler, 1999). Inicialmente foi descrito por induzir necrose em certos tumores (Arango Duque; Descoteaux, 2014). Possui a função de ativar células endoteliais e neutrófilos, age sobre o hipotálamo tanto promovendo, a supressão do apetite quanto induzindo a febre (Griffin et al, 2012). Também age no fígado elevando a produção da proteína C reativa (Arango Duque; Descoteaux, 2014). Promove a caquexia e apoptose de diferentes tipos celulares (Abbas et al, 2011), e é também um dos responsáveis pelo choque séptico (Arango Duque; Descoteaux, 2014). Seu excesso também favorece o surgimento de diferentes doenças como artrite reumatóide, psoríase, asma, câncer e outras doenças auto-imunes (Arango Duque; Descoteaux, 2014). Tanto a IL-1 quanto o TNF induzem a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (Abbas et al, 2011). A IL-6 atua tanto nas respostas inflamatórias agudas quanto nas respostas antiinflamatórias, interferindo nos processos de metabolismo, reparo de tecido e imunológico. Similar a IL-1 $\beta$  e ao TNF, a IL-6 é um pirógeno endógeno que promove a febre e a produção de proteínas da fase aguda no fígado (Arango Duque; Descoteaux, 2014). Induz a produção de neutrófilos na medula óssea, a diferenciação de linfócitos T *helper* produtores de IL-17 e a proliferação de linfócitos B. Pode ser produzida em resposta a IL-1 e TNF e participa da ativação do fator de transcrição STAT3 (Abbas et al, 2011). Seu papel antiinflamatório está relacionado a promover resistência a insulina e hepatoesteatose. Também inibe a apoptose e a regeneração das células endoteliais do intestino (Arango Duque; Descoteaux, 2014).

A IL-12, IL-15, IL-18, IL-23 e IL-27 são citocinas que agem principalmente sobre os linfócitos T e as células NK. A IL-12 é uma citocina formada por duas subunidades a

## Introdução

---

p35 e a p40 (Abbas et al, 2011; Arango Duque; Descoteaux, 2014). A sua forma ativa (subunidade p40) é produzida, essencialmente, por células apresentadoras de antígenos. Promove a produção de IFN-  $\gamma$  por células NK e linfócitos T, levando ao aumento da atividade citotóxica e a diferenciação dos linfócitos Th1 (Abbas et al, 2011). Também inibe a angiogênese, sendo, portanto, utilizada como marcador em cânceres e doenças auto-imunes (Arango Duque; Descoteaux, 2014). A IL-15 promove a proliferação de células NK e linfócitos T, assim como atua como fator de sobrevivência das células NK e dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória (Abbas et al, 2011). A IL-18 é um membro da família da IL-1, porém não é pirogênica, e pode atenuar a febre causada pela IL-1 (Arango Duque; Descoteaux, 2014). Esta citocina aumenta as funções das células NK e linfócitos T, estimulando a produção de IFN-  $\gamma$  agindo em sinergia com a IL-12. (Abbas et al, 2011). A IL-23 é similar a IL-12, portanto, induz a inflamação. Promove a produção de IFN-  $\gamma$  e ativação de células T, estando envolvida em diferentes doenças variando de psoríase a esquizofrenia (Arango Duque; Descoteaux, 2014). Também aumenta a liberação da IL-10 e induz a síntese de IL-17 pelos linfócitos T *naive*. A IL-27 é outro membro da família IL-12 e possui propriedades inflamatórias e antiinflamatórias. Pode inibir a diferenciação de células Th17 e induzir a diferenciação de linfócitos T *naive* (Iwasaki et al, 2015).

O TGF- $\beta$  e a IL-10 são citocinas reguladoras que atuam na geração e funcionamento das células T, mas também são produzidas por macrófagos ativados, assim como atuam sobre eles (Li et al, 2006; Kedzierski; Evans, 2014). O TGF- $\beta$  inibe a proliferação e funções de linfócitos T, neutrófilos, células endoteliais e a ativação clássica de macrófagos, mas também é produzido por macrófagos ativados alternativamente e mantém as funções das células T regulatórias (Tregs). Pode estimular a produção de anticorpos IgA, regular a diferenciação de subtipos de linfócitos T e promover o reparo do tecido quando as respostas inflamatórias reduzem (Li et al, 2006; Abbas et al, 2011; Arango Duque; Descoteaux, 2014). A IL-10 é produzida por macrófagos ativados, linfócitos B e T (Arango Duque; Descoteaux, 2014) e células dendríticas (Resende et al, 2013), porém também inibe as suas funções ao inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Abbas et al, 2011), a expressão de coestimuladores, e a expressão de moléculas MHC de classe II em células dendríticas

## Introdução

---

e macrófagos, inibindo assim suas atividades de apresentação de antígeno (Abbas et al, 2011; Arango Duque; Descoteaux, 2014). Assim o TGF- $\beta$  e a IL-10 atuam como reguladores de *feedback* negativo (Abbas et al, 2011).

A ativação do macrófago é essencial para a sua atividade microbicida, porém esta é dependente do microambiente em que está envolvido, podendo assim apresentar dois fenótipos distintos. Podem sofrer ativação clássica (M1) ou a ativação alternativa (M2) (Muraille et al, 2014). Essas ativações são dependentes da regulação de um grande número de genes. Apesar de serem vias bioquímicas distintas, ambas envolvem o metabolismo do aminoácido L-arginina. (Classen et al, 2009; Comalada et al, 2012).

A ativação clássica ocorre quando macrófagos são estimulados por citocinas do tipo Th1, como IFN- $\gamma$  e IL-12, ou por componentes microbianos, como o lipopolissacarídeo (LPS). Estes estímulos ativam a enzima óxido nítrico sintase induzível (NOS2/iNOS) que converte L-arginina em OH-arginina, e subsequentemente em óxido nítrico (NO) e citrulina (Classen et al, 2009; Comalada et al, 2012; Liu; Uzonna, 2012). Também passam a produzir altos níveis de citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-6; reativos de intermediários de oxigênio (ROI) e a apresentar alta atividade de apresentação de antígeno. Esse conjunto de ações direciona ao aumento da capacidade microbicida do macrófago (Muraille et al, 2014). Sendo assim, macrófagos M1 agem contra patógenos intracelulares e favorecem a resposta de linfócitos TCD4<sup>+</sup> Th1 (Muraille et al, 2014). Essa capacidade microbicida dos macrófagos é dependente de três mecanismos: a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a produção de óxido nítrico e de enzimas proteolíticas (Abbas et al, 2011). A geração do ROS ocorre através da ação da enzima oxidase fagocitária, que é ativada por diversos estímulos, incluindo o IFN- $\gamma$ . Esta reduz o oxigênio molecular em ROS, utilizando a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). Esse processo ocorre durante a respiração celular, sendo chamado de explosão respiratória. A enzima oxidase fagocitária também promove o aumento do pH e da osmolaridade no interior do vacúolo (Abbas et al, 2011). O NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino do L-arginina, que é convertido em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS), que possui uma variedade de isoformas que são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (c-NOS), que esta relacionada à

**Pereira, SS**

---

## Introdução

---

sinalização intracelular, e a NOS induzível (i-NOS), produzida pelos macrófagos e outras células. A c-NOS produz baixas quantidades de NO e a i-NOS requer algumas horas para ser expressa (Dusse et al, 2003) e não é expressa em macrófagos em repouso (Abbas et al, 2011), sendo necessário dois sinais: o primeiro o IFN- $\gamma$  e o segundo a ligação de um PAMP (padrões moleculares associados a patógenos) ou TNF (Horta et al, 2012). Apesar disso, libera altas quantidades de NO em comparação a c-NOS. Assim, o NO resultante da ativação da i-NOS possui grande ação citotóxica e combinando-se ao peróxido de hidrogênio ou ao superóxido, gerados pela oxidase fagocitária, produzem radicais de peroxinitrito promovendo a morte de micro-organismos no interior dos fagolisossomos (Dusse et al, 2003; Abbas et al, 2011). Todas as isoformas de NOS podem ser inibidas por análogos da arginina, como por exemplo, a N-imino-etil-L-ornitina (L-NIO). Estes análogos competem com a L-arginina e agem como inibidores estereoespecíficos da NOS. A aminoguanidina também é capaz de inibir a NOS agindo mais sobre a iNOS (Dusse et al, 2003).

A ativação alternativa ocorre pela presença de citocinas do tipo Th2, como IL-4 e IL-13, assim como da citocina regulatória IL-10 (Classen et al, 2009; Comalada et al, 2012). Alguns autores diferenciam o grupo M2 em três subtipos, que são dependentes do tipo de citocina estimulatória. Portanto, se os macrófagos forem expostos a IL-4 e a IL-13 serão do subtipo M2a; M2b quando forem estimulados por complexos imunológicos, tipo IL-1ra; e M2c quando estimulados por IL-10 (Gordon; Martinez, 2010; Muraille et al, 2014). Independente do subtipo, todos promovem a expressão da enzima Arginase I (Classen et al, 2009; Comalada et al, 2012). Esta inibe a expressão da iNOS e degrada a arginina em uréia e ornitina, que são metabolizadas em prolina e poliaminas (putrescina, espermidina e espermina). A prolina induz a produção de colágeno e as poliaminas estimulam à proliferação celular. Além disso, ambas catalizam o reparo da matriz extracelular lesionada, ao final do processo de inflamação (Classen et al, 2009; Comalada et al, 2012).

Ambas as vias, como visto anteriormente, são dependentes do aminoácido arginina. Portanto, a atividade da iNOS e da arginase é regulada pela disponibilidade do aminoácido L-arginina. Porém a síntese de L-arginina pelas células é insuficiente para

## Introdução

---

algumas atividades celulares, incluindo a produção de NO e poliaminas (Wanassen; Soong, 2008). Com isso, o transporte do L-arginina do meio extracelular é de grande importância para proliferação e ativação de macrófagos (Comalada et al, 2012).

Assim, há diferentes vias de entrada da arginina, sendo que o sistema  $y^+$  é tido como a principal via de entrada na maioria das células. Os transportadores do sistema  $y^+$  incluem os transportadores da família de aminoácidos catiônicos (CAT) (Wanassen; Soong, 2008). Nos macrófagos, o membro da família CAT mais relevante é CAT-2 (Wanassen; Soong, 2008; Classen et al, 2009) codificado pelo gene *Slc7a2* (Sans-Fons et al, 2013). O CAT2 pode ter duas formas de expressão, a CAT-2A que é expressa constitutivamente pelas células musculares e do fígado e, CAT-2B que é expressa em macrófagos e altamente regulada por IFN- $\gamma$ , LPS, IL-4 e o fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (Wanassen; Soong, 2008; Comalada et al, 2012).

Na infecção por *Leishmania*, os macrófagos são as principais células infectadas nos hospedeiros, sendo indispensáveis para sua sobrevivência. A interação da *Leishmania* com seu hospedeiro principal ocorre através de moléculas de superfície. No caso das promastigotas, receptores de complemento CR1, CR3 (Mac-1), receptor de fibronectina e o receptor de manose na superfície do macrófago desempenham importante papel na ligação com os parasitos (Liu; Uzonna, 2012). A molécula de superfície lipofosfoglicano (LPG), a GP63 e protofosfoglicano (PPG) de promastigotas de *L. major* são importantes para fagocitose inicial e posterior sobrevivência do parasito intracelular, assim como no caso das amastigotas, que revestidas com IgG do hospedeiro, conseguem se ligar a receptores Fc (Fc $\gamma$ R) em macrófagos que facilitam sua entrada (Liu; Uzonna, 2012).

O controle do parasito está relacionado com a ativação clássica do macrófago, em que ativar uma resposta mediada por linfócitos TCD4<sup>+</sup> Th1 e aumentará a capacidade leishmanicida do macrófago (Wanassen; Soong, 2008; Muraille et al, 2014). Green et al (1990) observaram que macrófagos *in vitro* infectados por amastigotas de *L. major* e, estimulados com IFN- $\gamma$  e LPS eliminaram os parasitas intracelulares. Assreuy et al (1994), viram que macrófagos estimulados com IFN- $\gamma$  e LPS eliminam a *L. major*, e que

## Introdução

---

esse efeito é bloqueado quando adicionado N-imino-etil-L-ornitina, que é um inibidor da iNOS. Iniesta et al (2001) demonstraram que macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c infectados com promastigotas de *L. major* e *L. infantum* tratados com LOHA (N-hidróxi-L-arginina), uma molécula intermediária no processo de produção de NO e que inibe a ação da enzima arginase, conseguem inibir o crescimento do parasito durante o curso da infecção (48h). Ao analisarem o papel da LOHA em lisados de promastigotas *L. major* e *L. infantum*, puderam observar que ambas as espécies tinham arginases funcionais e que estas eram inibidas eficientemente. Porém, é visto que uma ativação alternativa do macrófago favorece a proliferação do parasito, pois as poliaminas são importantes suportes nutricionais a ele (Wanasen; Soong, 2008; Muraille et al, 2014). Em experimentos com a *L. donovani* pode-se ver que o parasito consegue transportar L-arginina através de uma permease aminoácido chamado LdAAP3 que comparada ao CAT-2B, encontrado em macrófagos, possuem atividades distintas. A CAT-2B possui sua funcionalidade reduzida à metade quando em pH baixos, e a LdAAP3 é altamente ativa em pH5.5, que é o pH encontrado dentro dos vacúolos parasitóforos. Portanto, o transporte do L-arginina do meio extracelular também é importante para o crescimento do parasito quando ativada a enzima arginase e, eliminação do parasito nas células infectadas quando ativada a enzima iNOS (Wanasen; Soong, 2008).

Para evitar a morte por macrófagos ativados, a *Leishmania* deve manipular as vias de ativação em um sentido que lhe favoreça a sobrevivência e proliferação. Uma dessas vias é suprimir a produção de IL-12 que é necessária para a ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th1 (Liu; Uzonna, 2012), pois a ativação deste tipo celular promove a eliminação do parasito (Alexander; Bryson, 2005).

O modelo de infecção por *L. major* permitiu a demonstração da relevância do modelo Th1/Th2 *in vivo* (Sacks; Noben-Trauth, 2002). De modo geral, uma resposta protetora contra parasitos da *L. major* é associada a uma resposta imunológica celular do tipo Th1 e produção de IFN- $\gamma$ , e uma resposta não protetora é associada a uma resposta imunológica celular do tipo Th2 e produção de IL-4 (Kedzierski; Evans, 2014). A maioria das linhagens homozigotas de camundongo, como C57BL/6, C3H,

## Introdução

---

CBA, pode controlar a infecção por *L. major*, e apenas algumas linhagens, como BALB/c, desenvolvem a doença progressiva (Sharma; Singh, 2009; Kropf et al 2004). Essas linhagens resistentes quando infectadas com este parasito desenvolvem uma resposta direcionada pelas células T CD4<sup>+</sup> Th1, produzindo IFN- $\gamma$  e IL-2, que é altamente efetiva para ativar os mecanismos leishmanicidas e inflamatórios dos macrófagos, levando à destruição dos parasitos intracelulares. No entanto, parasitos latentes permanecem no tecido infectado, gerando produções contínuas de antígenos capazes de manter uma resposta imunológica protetora que impede re-infecções. Por outro lado, a linhagem BALB/c quando infectada com a mesma espécie de parasito desenvolve uma resposta direcionada pelas células T CD4<sup>+</sup> Th2, produzindo IL-4, IL-5 e IL-10, que não é eficiente para promover a ativação clássica dos macrófagos, levando ao desenvolvimento progressivo da doença (Afonso; Scott, 1993; Sharma; Sing, 2009; Mendes Wanderley et al, 2012; Kedzierski; Evans, 2014).

Nas últimas décadas, a dicotomia Th1/Th2 vem sendo questionada desde que estudos demonstraram que a produção de IL-4 na fase inicial da infecção não é requerida para promover a suscetibilidade (Sacks; Noben-Trauth, 2002). Camundongos C57BL/6 produzem IL-4 na fase inicial da infecção por *L. major* e isso não o impede de montar uma resposta mediada por linfócitos Th1 e solucionar a doença (Kedzierski; Evans, 2014). Noben–Trauth et al (1996) demonstraram que camundongos BALB/c IL-4<sup>-/-</sup> continuaram suscetíveis a infecção por *L. major*, não demonstrando nenhum sinal de eliminação do parasito ou resolução da lesão, assim como não inverteram o fenótipo para Th1. Porém, Kopf et al (1996) mostraram que camundongos BALB/c IL-4<sup>-/-</sup> infectados por *L. major*, conseguiam controlar a infecção e mesmo na ausência da IL-4, os níveis das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF, IL-1 $\alpha$ , IL-12 e TGF- $\beta$  foram mantidas, além da atividade da iNOS.

Trabalhos com outras espécies de *Leishmania*, especialmente do Novo Mundo, também questionam este paradigma. Satoskar et al (1995) observaram que células de baço de camundongos IL-4<sup>-/-</sup> infectados por *L. mexicana* demonstraram níveis de IFN- $\gamma$  maiores do que os dos camundongos IL-4<sup>+/+</sup>, inibindo, portanto, a proliferação do parasito. Ao mesmo tempo, quando avaliaram células do linfonodo drenante de

## Introdução

---

camundongos IL-4<sup>+/+</sup> observaram níveis de IL-5 maiores dos que observados nos camundongos IL-4<sup>-/-</sup>. E no mesmo estudo, utilizando amastigotas de *L. donovani*, foi visto que havia mais amastigotas em camundongos IL-4<sup>-/-</sup>, do que nos IL-4<sup>+/+</sup> indicando um papel potencialmente protetor da IL-4 na infecção por *L. donovani*. Com esses resultados, foi possível notar que mesmo na ausência de IL-4 o desenvolvimento de células Th2 e de citocinas do tipo Th2 continuaram presentes, embora em diferentes proporções Th1/Th2 (Hurdal; Bombacher, 2014). Afonso e Scott (1993) observaram que camundongos C57BL/10 quando infectados por *L. amazonensis* desenvolvem uma lesão progressiva, sendo, portanto, suscetíveis à infecção. Diferente do que ocorre com os animais BALB/c quando infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*, no C57BL/10 há uma produção mínima de IL-4 no início da infecção e não há produção na fase tardia. Além disso, no baço não há produção de IL-4 em nenhum momento da infecção, sugerindo que nunca foi estabelecida uma resposta do tipo Th2. Assim eles acreditam que a produção de IL-4 no C57BL/10 quando infectado por *L. amazonensis* não é o maior fator que favorece a suscetibilidade. Carvalho et al (2012) realizaram estudos com camundongos BALB/c infectados subcutaneamente no coxim plantar com promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* e puderam observar que em 4 semanas após a infecção, camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* apresentavam maior carga parasitária e crescimento progressivo da lesão quando comparados com os camundongos infectados com *L. braziliensis* e o controle. Oito semanas após a infecção a carga parasitária e o tamanho da lesão em camundongos infectados por *L. braziliensis* reduziram significativamente, enquanto nos infectados com *L. amazonensis* continuaram a aumentar progressivamente. Diferenças em relação a densidade celular, também foram observadas, onde em quatro semanas após a infecção a densidade de células TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na lesão de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* era maior do que as dos infectados por *L. braziliensis*, porém oito semanas após a infecção houve uma inversão, em que camundongos infectados por *L. braziliensis* apresentaram maior quantidade de células TCD8<sup>+</sup> do que os infectados por *L. amazonensis*, e houve também aumento das células TCD4<sup>+</sup>, mas não mais do que os infectados por *L. amazonensis*. Também avaliaram as citocinas IL-4 e IL-10 e IFN- $\gamma$  e observaram que os níveis de IL-4, em quatro semanas de infecção



## Introdução

---

foram maiores na infecção por *L. amazonensis*, do que na infecção por *L. braziliensis*, sendo que oito semanas após a infecção não foi possível mais detectar níveis de IL-4 na infecção por *L. braziliensis*, seguindo o mesmo padrão a citocina IL-10. Já o IFN- $\gamma$  apresentou altos níveis na infecção por *L. braziliensis* quando comparados a infecção por *L. amazonensis*, nos diferentes tempos analisados. Portanto, dependendo da espécie de *Leishmania* e do “background” genético do camundongo, são obtidos diferentes perfis de resposta, demonstrando que a polarização da resposta Th1/ Th2 não é padrão para todas as combinações de linhagens de camundongos e espécies de *Leishmania* (Sharma; Singh, 2009; Horta et al, 2012).

É também estudado o papel da IL-10 na regulação da resposta imunológica. Kane e Mosser (2001) demonstraram que a produção de IL-10 é dependente da presença do receptor Fc $\gamma$ R, e que camundongos BALB/c IL-10<sup>-/-</sup> infectados com *L. major* apresentavam lesões menores e carga parasitária 100 vezes menor quando comparado com camundongos selvagens. Belkaid et al (2001) relataram que camundongos C57BL/6 deficientes para citocina IL-10 infectados por *L. major* produziram altos níveis de IFN- $\gamma$  que permitiram a eliminação total do parasito, enquanto os camundongos selvagens possuíam um número de parasitos persistentes no sitio da infecção embora clinicamente curados. Estas observações demonstram que esta citocina está relacionada com a imunopatologia observada na leishmaniose cutânea. Porém, na leishmaniose mucocutânea, a produção de IL-10 é reduzida e possui uma resposta inflamatória com alta produção de IFN- $\gamma$  e TNF promovendo o desenvolvimento da doença, juntamente com aumento da produção de IL-17 (Novoa et al, 2011). Gonzalez-Lombana et al (2013) conseguiram demonstrar em estudos com modelo murino que a exacerbação da doença não é devido ao aumento da produção de IFN- $\gamma$  e sim pelo aumento da IL-17 que exacerba a infecção quando não regulada pela IL-10.

Além das citocinas, outras moléculas do macrófago também podem afetar a resistência/suscetibilidade de camundongos à *Leishmania*. Estudos na década de 70 utilizando diferentes linhagens de camundongos que apresentavam diferentes perfis de resposta contra *L. donovani*, sendo uns resistentes e outros sensíveis, mostraram que essa suscetibilidade era correlacionada a um único gene que não possuía ligação com

## Introdução

---

o locus H2. (Bradley; Kirkley,1977; Bradley,1977). Em 1984, Crocker et al, passaram a designar o gene correlacionado a essa resistência natural e suscetibilidade a *L. donovani* de *Lsh*, e que esse era homólogo aos genes *Bcg* e *Ity*, que controlavam a resposta inicial as infecções de *Salmonella typhimurium* e *Microbacterium bovis*, respectivamente. Posteriormente, determinou-se que este gene, então chamado Bcg/Lsh/Ity, localizava-se no cromossomo 1 e afetava a capacidade dos macrófagos de destruir parasitas intracelulares ingeridos durante a fase inicial da infecção. Viu-se também que os macrófagos expressavam um gene chamado *Nramp* que codificava uma proteína transmembrana de transporte (Vidal et al, 1993). Essa proteína está localizada na membrana de endossomos tardios e lisossomos, e exerce a função de transportar cátions divalentes ( $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ ) em ambas as direções contra o gradiente de prótons, acidificando a organela (revisado por Blackwell et al, 2001) e que a suscetibilidade a infecção por parasitas intracelulares era devida a uma mutação pontual (Asp→Gly) nesse gene (Vidal et al, 1993). Estudos subsequentes, comprovaram que a resistência natural era controlada pelo *Nramp*, e que camundongos *Nramp*<sup>-/-</sup> não controlavam a fase inicial da infecção, mas podiam controlar a fase tardia, (Vidal et al 1995), sendo que esse controle tardio estava relacionado ao locus H2, que expressa os complexos principais de histocompatibilidade (MHCs), que são controlados pelo locus *Lsh*, assim como visto nas infecções por *L. infantum* (Leclercq et al, 1996).

A suscetibilidade e resistência em modelos de camundongos infectados por *Leishmania* é ainda estudada em relação as células B e as células T regulatórias (Treg). Ronet et al (2010) analisaram camundongos BALB/c infectados com *L. major*, e viram que células B produziam IL-10 em resposta a *L. major* e que isso favorecia o desenvolvimento de uma resposta Th2, mas que em camundongos C57BL/6 não era visualizada essa produção. Em infecções por *L. donovani* é relatado que células B da zona marginal suprimem uma resposta mediada por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> durante a fase inicial da infecção e a depleção destas células aumenta a resistência à infecção por *L. mexicana* e *L. tropica* em camundongos BALB/c (Bankoti et al, 2012) demonstrando assim um papel destas células na suscetibilidade a leishmaniose. As células Treg já foram demonstradas desempenhando papel na manutenção e desenvolvimento da infecção por *L. major* persistente em modelos murinos, onde elas

## Introdução

---

aparecem suprimindo a resposta imunológica de células T efetoras, sendo esse controle dependente ou independente de IL-10 (Belkaid et al, 2002). Mendez et al (2004) relataram que o aumento das células Treg favorece reativações de infecções por *L. major*. Ao realizarem experimento em que deletavam as células Treg houve o fortalecimento da resposta imunológica associada a um aumento de células T CD4<sup>+</sup>, produzindo IFN-  $\gamma$ , que preveniu uma reativação da infecção. Assim, mostraram que para controlar uma resposta imunológica recidiva e reativação da doença é necessário um equilíbrio entre as células Treg e os linfócitos efetores e que a persistência do parasito no hospedeiro é benéfica para ambas as partes, pois o parasito se beneficia podendo ser transmitido para novos hospedeiros e o hospedeiro por ter uma resposta de memória eficiente, principalmente para aqueles que residem em áreas endêmicas (Kling; Körner, 2013).

Atualmente, é evidente que o modelo de suscetibilidade e resistência à infecção por *Leishmania* proposto no passado é bastante reprodutível quando se trabalha com *L. major*. Entretanto, para outras espécies de parasitos e/ou linhagens de camundongos, o quadro é relativamente mais complexo, podendo obter-se diferentes padrões de respostas (Sharma; Singh, 2009; Mendes Wanderley et al, 2012). Por exemplo, a infecção experimental com *L. amazonensis* direciona para uma doença progressiva e desenvolvimento das lesões ulceradas e necrosantes. Este perfil pode ser observado na maioria das linhagens de camundongos homozigotas, incluindo aqueles que são resistentes à infecção por *L. major* (Mendes Wanderley et al, 2012). Segundo alguns autores, a infecção de camundongos BALB/c, C57BL/6 e C57BL10 provoca uma doença progressiva, podendo levar mesmo à perda da pata sítio inicial de infecção. Por outro lado, camundongos C3H/He mostram-se menos suscetível à infecção por esta espécie de parasito, desenvolvendo apenas uma pequena pápula, no sítio inicial de infecção, que regride espontaneamente (de Oliveira Cardoso et al, 2010). Em análises histopatológicas da pele desses animais foi possível observar que camundongos C3H/He, diferentemente dos camundongos BALB/c possuem a capacidade de restaurar os componentes da matriz extracelular após a infecção (Silva-Almeida et al, 2012). Além disso, em análises de soro de camundongos sensíveis e resistentes a infecção por esta espécie de *Leishmania*, foi observado um mix de citocinas Th1/Th2 (Cardoso, 2006).

**Pereira, SS**

---

## Introdução

---

Embora os macrófagos sejam as principais células hospedeiras da *Leishmania*, sua função é sempre descrita de forma dependente das células T. Pouco se sabe do que ocorre com essa célula na fase anterior ao contato com as células T. É possível que, em benefício próprio, o parasito module a resposta dos macrófagos na fase inicial da infecção, interferindo nas vias de sinalização e apresentação de antígenos, modulando assim seu contato com as células T (Sharma; Singh, 2009). Neste trabalho estudamos a infecção de macrófagos ex vivo, de forma isolada de células T. Queremos saber se este primeiro contato do parasito com sua célula hospedeira já é influenciado pelo *background* genético do macrófago e quais são os mecanismos envolvidos nesta possível resistência. Portanto, no nosso trabalho, estudamos a resposta imunológica de macrófagos de três linhagens de camundongos com diferentes graus de suscetibilidade à infecção frente a um isolado altamente virulento de *L. amazonensis*.

## **2. OBJETIVOS**

---

## Objetivos

---

### 2.1 Objetivo geral

Estudar a resposta à infecção de macrófagos peritoneais obtidos de linhagens de camundongos com diferentes graus de sensibilidade à *L. amazonensis*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Comparar a multiplicação de amastigotas no interior de macrófagos peritoneais de camundongos das linhagens BALB/c, C57BL/10 e C3H/He por microscopia de luz;
- Avaliar a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais infectados, originários das linhagens BALB/c, C57BL/10 e C3H/He;
- Avaliar a produção de citocinas por macrófagos peritoneais infectados, originários das linhagens BALB/c, C57BL/10 e C3H/He;
- Estudar a resposta de macrófagos peritoneais originários das linhagens BALB/c, C57BL/10 e C3H/He a estímulo pró-inflamatório;
- Analisar o efeito do óxido nítrico na multiplicação das amastigotas no interior de macrófagos peritoneais de camundongos das linhagens BALB/c, C57BL/10 e C3H/He através da inibição da enzima iNOS.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

---

### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos adultos das linhagens BALB/c, C57BL/10 e C3H/He, fêmeas, com idade entre 6 e 8 semanas, obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório da FIOCRUZ (CECAL-FIOCRUZ) e mantidos no biotério de experimentação do pavilhão Hélio Peggy Pereira (HPP), sob temperatura controlada, alimentação com ração apropriada e água filtrada *ad libitum*. Todos os procedimentos com os animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética de Uso de Animais de Laboratório da FIOCRUZ (CEUA-FIOCRUZ) sob o número de licença LW38/13.

### 3.2 Parasito

O isolado de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* MHOM/BR/2000/MS501, foi obtido de um aspirado de medula óssea de um caso humano de leishmaniose visceral oriundo de Bodoquena, Mato Grosso do Sul, Brasil e foi gentilmente cedida pelo Departamento de Patologia, laboratório de Parasitologia Humana da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMT).

#### 3.2.1 Caracterização do Parasito

Parasitas de cultura axênica foram caracterizados pelas técnicas de PCR por restrição de fragmentos polimórficos (RFLP), sequenciamento e eletroforese enzimático de multi-locus. A caracterização por isoenzimas foi realizada por Dra Raquel Pacheco do Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/RJ, e a RLFP e sequenciamento de fragmento do gene da *hsp70* foi realizada por Dra Célia Maria Ferreira Gontijo do Grupo de Estudos em Leishmanioses, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brasil.

#### 3.2.2 Cultivo e manutenção do parasito

O parasito foi mantido em passagens seriadas em camundongos BALB/c fêmeas. Desta forma, sempre que necessário um animal foi eutanasiado, tendo seu linfonodo poplíteo retirado para isolamento de parasitos, que foram colocados a 26°C em meio



bifásico com ágar-sangue (NNN, Novy e MacNeal, 1904; Nicolle, 1908) como fase sólida e meio Schneider (suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab), 100U/mL de penicilina e 10µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich)) como fase líquida, onde deram origem a formas promastigotas. Novos animais foram periodicamente inoculados e mantidos no biotério de experimentação para novos isolamentos.

Promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/2000/MS501) foram mantidas em cultura axênica em meio Schneider (suplementado conforme descrito anteriormente) a 26°C em estufa incubadora BOD (Fanem-347). A cepa foi mantida também criopreservada em alíquotas. A cultura foi repicada a cada 7 dias por no máximo 6 vezes, após os quais uma nova alíquota era descongelada, a fim de se manter a infectividade da cepa.

### 3.3 Obtenção de Macrófagos Peritoneais

Camundongos das linhagens BALB/c, C57BL/10 e C3H/He obtidos do CECAL-FIOCRUZ foram inoculados com 3mL de tioglicolato a 3% (Lam et al, 2013) por via intraperitoneal. Após três dias estes animais foram eutanasiados e submetidos a lavado peritoneal com PBS ph 7.0 (NaCl 137mM; KCl 2,7mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,88 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,4mM; H<sub>2</sub>O q.s.p 1L). O lavado peritoneal foi centrifugado a 1500rpm por 5 minutos (centrifuga Jouan BR4i, rotor S40) O sobrenadante foi descartado e ressuspendido em meio RPMI - 1640 sem vermelho de fenol (Sigma-Aldrich). Os macrófagos assim obtidos foram quantificados em câmara de Neubauer utilizando-se o corante vital azul de trypan 0,4% (Sigma). Após contagem, os macrófagos foram diluídos em meio RPMI sem vermelho de fenol suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 200mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina e 10µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich) de acordo com a concentração necessária ao experimento e plaqueados em placas de 96 poços ou 24 poços de acordo com o experimento em curso, sendo mantidos à 34°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.4 Infecção de macrófagos peritoneais

Para a infecção, culturas axênicas de promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária foram centrifugadas a 4000rpm (centrifuga Jouan BR4i, rotor S40) e ressuspendidas em meio Schneider. Posteriormente, foram contadas em câmara de Neubauer para concentração de 2 parasitos por células, de acordo com cada experimento.

Antes do início dos protocolos propriamente ditos, foram realizados alguns testes para padronizar a densidade de células por poço e intensidade do inóculo. Assim para testar a densidade de células no poço, foram realizadas culturas com  $1 \times 10^6$  e  $2 \times 10^5$  células/ml. As células foram plaqueadas em lamínulas redondas em placas de 24 poços. E para padronizar a intensidade da infecção, para cada cultura de célula infectamos com 2 e 5 promastigotas/célula. As culturas foram lavadas após 6 h de infecção e as lamínulas fixadas e coradas 24, 48, 72 e 96 h após a infecção. Após 24h, as lamínulas foram fixadas por bouin e coradas pelo giemsa (conforme técnica descrita a seguir) e a densidade observada em microscopia de luz.

A partir dos resultados obtidos com a padronização, a infecção dos protocolos experimentais foi realizada da seguinte forma: os macrófagos peritoneais das diferentes linhagens de camundongos foram infectados por promastigotas de *L. amazonensis* sempre numa proporção de 2 parasitos/célula. As formas promastigotas foram deixadas em contato com as células por 6 horas, no fim das quais a cultura foi lavada com PBS pH 7.0 para retirada das promastigotas do sobrenadante.

### 3.5 Desenho experimental

Esta dissertação se dividiu em 3 protocolos experimentais independentes. Primeiramente foi estudada a taxa de infecção em macrófagos peritoneais, porém sem quaisquer outros estímulos a não ser o tioglicolato usado nos camundongos. Em seguida foi estudada a infecção de macrófagos com alta produção de NO. Para isso, as células foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ). Finalmente, foi realizado um último protocolo em que a enzima iNOS foi inibida pela ação da aminoguanidina. Todos os protocolos experimentais foram realizados a partir

da obtenção de macrófagos peritoneais de BALB/c, C57BL/10 e C3H/He, conforme descrito anteriormente. Estes foram plaqueados sobre lamínulas na densidade de  $2 \times 10^5$ /mL no caso dos experimentos em que se queria analisar a taxa de infecção (ver a seguir) e diretamente na placa na densidade de  $5 \times 10^6$ /mL para os experimentos de dosagem de citocinas e NO. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.5.1 Protocolos sem estímulo

Macrófagos peritoneais das três linhagens foram plaqueados na concentração desejada e após 20 minutos foram lavados para retirada de células não aderidas. No dia posterior, foram infectados com *L. amazonensis*, e lavadas após 6h de infecção. Nos tempos de 24, 48, 72 e 96h após a infecção as lamínulas foram retiradas para fixação e coloração (ver a seguir). No caso dos experimentos de dosagem, nestes mesmos pontos o sobrenadante foi recolhido, aliquotado e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise. Este protocolo foi realizado três vezes.

### 3.5.2 Protocolos com estímulos de LPS e IFN- $\gamma$

Antes de se realizar os experimentos propriamente ditos, foram feitos testes para padronizar a melhor dose de LPS (Sigma-Aldrich) e IFN- $\gamma$  recombinante de camundongo (BD Pharmingen™, BD Biosciences) a serem utilizados. Primeiramente macrófagos peritoneais de C57BL/10 foram plaqueados em placas de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^6$ /mL. Posteriormente foram adicionados LPS nas concentrações de 500ng/mL, 1 $\mu$ g/mL, 5 $\mu$ g/mL e 10 $\mu$ g/mL. Nos tempos de 24, 48, 72 horas o sobrenadante foi recolhido e a dosagem de NO realizada pela reação de Griess (ver a seguir). Em seguida foram feitos testes de concentração de IFN- $\gamma$ . Macrófagos peritoneais das três linhagens foram plaqueados em placas de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^6$ /mL. Posteriormente foram adicionados LPS (5 $\mu$ g/mL) e IFN- $\gamma$  nas seguintes concentrações: 2ng/mL, 5ng/mL, 10ng/mL e 20ng/mL. Nos tempos de 24, 48, 72 horas foi realizada a reação de Griess para dosagem de NO.

Para os experimentos propriamente ditos, os macrófagos peritoneais foram plaqueados e lavados após 20 minutos. No dia seguinte, foram infectados por promastigotas de *L. amazonensis*. Após as 6h de infecção as células foram lavadas

com PBS e em seguida foram adicionadas ao meio 5 µg/mL de LPS e 2ng/mL de IFN-γ. Nos tempos de 24, 48, 72 e 96h após a infecção as lamínulas foram retiradas para fixação e coloração (ver a seguir). No caso dos experimentos de dosagem, nestes mesmos pontos o sobrenadante foi recolhido, aliquotado e congelado a -20°C para posterior análise. Este protocolo foi realizado três vezes.

### 3.5.3 Protocolos de inibição da iNOS

Macrófagos peritoneais de C57BL/10 foram plaqueados em placas de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^6$ /mL, com poços com e sem infecção. Seis horas depois da infecção, as células foram lavadas e foi adicionado a solução de aminoguanidina (Sigma-Aldrich) nas seguintes concentrações 1µg/mL, 10µg/mL e 100µg/mL acrescidas de 5µg/mL de LPS. Foi realizado um poço controle positivo com de LPS e um poço controle negativo (sem LPS). Nos tempos de 72 horas foi recolhido sobrenadante para a dosagem de NO pela reação de Griess.

Nos experimentos propriamente ditos, após seis horas de infecção a cultura de célula foi lavada e foram adicionados ao meio de cultura somente aminoguanidina (100µg/mL). Nos tempos de 24, 48, 72 e 96h após a infecção as lamínulas foram retiradas para fixação e coloração (ver a seguir). Este protocolo foi realizado uma vez.

### 3.6 Avaliação da carga parasitária intracelular e taxa de infecção de macrófagos

As lamínulas obtidas nos experimentos, nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h após a infecção, foram lavadas 2 vezes com PBS pH 7.0, fixadas com bouin por 5 minutos, logo após lavadas em álcool 70% duas vezes por 30 minutos. Posteriormente, foram coradas por Giemsa (diluição 1:10) por 60 min e depois realizado procedimento de desidratação, que consiste em lavar as lamínulas em soluções de acetona pura (2x), 70% acetona + 30% xilol, 50% acetona+ 50% xilol, 30% acetona+70% xilol, xilol puro (2x), nesta mesma sequência aqui descrita. Após desidratação são coladas em laminas com entellan® (Merck).

As lamínulas foram então observadas em microscopia de luz e 100 células de

cada foram contadas, anotando-se a presença ou não de amastigotas e, em caso afirmativo, o número de amastigotas intracelulares. Assim, foram calculadas e porcentagem de células infectadas (taxa de infecção), média de amastigotas por célula (levando em conta somente as células infectadas) e número total de amastigotas por 100 células.

### 3.7 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO)

A dosagem de NO nos sobrenadantes de cultura foi feita pela reação de Griess (Green et al, 1982). Para tal, 50µL do sobrenadante de cada poço foi plaqueado em placa de 96 poços. Logo após foram adicionados 25µL da solução de N-(1-Naftil) etilenodiamina dicloridrato (Sigma-Aldrich) 0,1% em todos os poços, e sequencialmente adicionado 25µL da solução de sulfanilamida (Fluka) 1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2,5%. Posteriormente, foi deixado fora do alcance de luz por 10 minutos e realizado a leitura da placa. A leitura da placa foi realizada no espectrofotômetro EZ Read 400, Biochrom, utilizando o software Galapagos Expert versão 1.1, na faixa de 570 nM. Para a curva padrão de nitrito de sódio é realizado uma diluição seriada a metade, que possui 8 pontos, incluindo o branco, iniciando na concentração de 100µM.

### 3.8 Dosagem de citocinas

A dosagem de citocinas foi realizada em sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais previamente coletados. As citocinas estudadas foram IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 através da técnica imunoenzimática ELISA. Os seguintes kits foram utilizados: BD OptEIA™ Mouse IFN- $\gamma$  ELISA Set Cat 555138, BD OptEIA™ Mouse IL-12 (p70) ELISA Set Cat 555256, BD OptEIA™ Mouse IL-1  $\beta$  ELISA Set Cat 559603, BD OptEIA™ Mouse IL-10 ELISA Set Cat 555252, BD OptEIA™ Mouse TNF ELISA Set II Cat 558534, R&D Systems DuoSet ELISA Development System Mouse IL-6 Cat DY406.

Esta técnica foi realizada seguindo as instruções dos fabricantes, utilizando sempre 100µL do sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais sem qualquer diluição em placas de 96 poços Nunc Maxisorp®. As placas foram recobertas com anticorpo de captura específico de cada citocina a ser dosadas e deixadas *overnight* a 4°C, com exceção da citocina IL-6 que foi deixada a temperatura ambiente. No dia

## **Material e Métodos**

---

seguinte, as placas foram lavadas e posteriormente bloqueadas. Após bloqueio foram adicionadas as amostras de sobrenadantes e realizada nova incubação. Na etapa seguinte, após a lavagem das placas, foi acrescentado anticorpo de detecção específico de cada citocina conjugado a biotina. Após nova incubação, adicionou-se solução de estreptovidina conjugada a peroxidase e incubou-se novamente. Após nova lavagem, foi adicionada solução de tetrametilbenzidina com peróxido de hidrogênio, que reage com a peroxidase e adquire uma cor azul. A reação em questão foi interrompida com ácido sulfúrico 2N e lida a 450nm com correção em 540nm em espectrofotômetro EZ Read 400, Biochrom, utilizando o software Galapagos Expert versão 1.1. Todas as lavagens foram realizadas em um lavador automático de placas (BioRad – Immunowash 1575). Curvas padrões foram construídas a partir de amostras de citocinas recombinantes com concentrações conhecidas.

## **4. RESULTADOS**

---

### 4.1 Padronização da concentração de células e infecção

A análise das lâminas para padronização da concentração de células e infecção demonstrou que a concentração de  $1 \times 10^6$  de macrófagos não permitia uma boa visualização da infecção, sendo observadas células em demasia e sobrepostas. Já a concentração de  $2 \times 10^5$  macrófagos possibilitou uma melhor visualização das células. Paralelamente, as lâminas infectadas com 5 MOI (multiplicidade de infecção) também foram de difícil contagem, encontrando-se algumas células com um número incontável de amastigotas. Na infecção com 2 MOI foi possível realizar uma contagem fidedigna do número de amastigotas por célula. Finalmente a concentração de  $2 \times 10^5$  macrófagos/poço infectados com  $4 \times 10^5$  promastigotas permitiu que nem todas as células se infectassem, possibilitando assim uma visualização das diferenças entre as 3 linhagens estudadas (Figura 4.1, 4.2, e 4.3).

### 4.2 Protocolos sem estímulo

#### 4.2.1 Avaliação da carga parasitária intracelular e taxa de infecção de macrófagos

A análise da quantidade de amastigotas por célula não apresentou diferenças significativas entre as linhagens em estudo independente do tempo de infecção (Figura 4.4A). Por outro lado, a análise da porcentagem de células infectadas (taxa de infecção) e a quantidade total de amastigotas por 100 células (carga parasitária total), mostraram que na fase inicial da infecção não houve diferença entre as linhagens, no entanto, a partir de 72 horas as células de origem C3H/He apresentaram menor taxa de infecção e menor número total de amastigotas quando comparadas com células de origem BALB/c. (Figura 4.4B e C).

#### 4.2.2 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO)

Não houve diferenças de produção de NO entre os macrófagos das diferentes linhagens, em quaisquer dos tempos de infecção estudados, independente dos macrófagos estarem infectados ou não (Figura 4.5). A quantidade de nitrito medida em todo o experimento foi muito baixa, indicando que praticamente não houve produção de NO por nenhuma das linhagens estudadas.



### 4.2.3 Dosagem de citocinas

A dosagem de citocinas no sobrenadante das culturas de macrófagos mostrou que as células de origem C3H/He produziram altos níveis de IFN- $\gamma$ , independente de estarem infectadas ou não, sendo estes significativamente maiores do que a produção dos macrófagos de BALB/c e C57BL/10 (Figura 4.6 A ,B e C)

Os macrófagos de camundongos BALB/c e C3H/He infectados ou não produziram baixos níveis da citocina IL-1 $\beta$  em todos os tempos da infecção, com um pico em 96h, onde as células não infectadas, de origem C3H/He, mostraram uma produção maior quando comparados com os BALB/c e C57BL/10. Os macrófagos C57BL/10 produziram níveis muito baixos ou indetectáveis ao longo de todo o experimento quando comparados com os macrófagos BALB/c e C3H/He (Figura 4.7A e B). Não foi visualizada diferença na produção de IL-1 $\beta$  entre os macrófagos controle e infectados de cada linhagem (Figura 4.7C).

Os macrófagos não infectados de C3H/He produziram níveis da citocina IL-12, numa quantidade significativamente superior à produzida pelas células de BALB/c e C57BL/10. Quando infectados, os macrófagos de BALB/c aumentaram sua produção de IL-12, especialmente no início da infecção, igualando com os níveis apresentados por macrófagos de C3H/He, que mantiveram a mesma produção das células controle. As células de C57BL/10 mantiveram níveis baixos de produção de IL-12, com um pequeno pico às 48h (Figura 4.8 A e B). Somente às 24 horas de infecção de macrófagos BALB/c foi possível observar diferença de produção entre os controles e os infectados (Figura 4.8C)

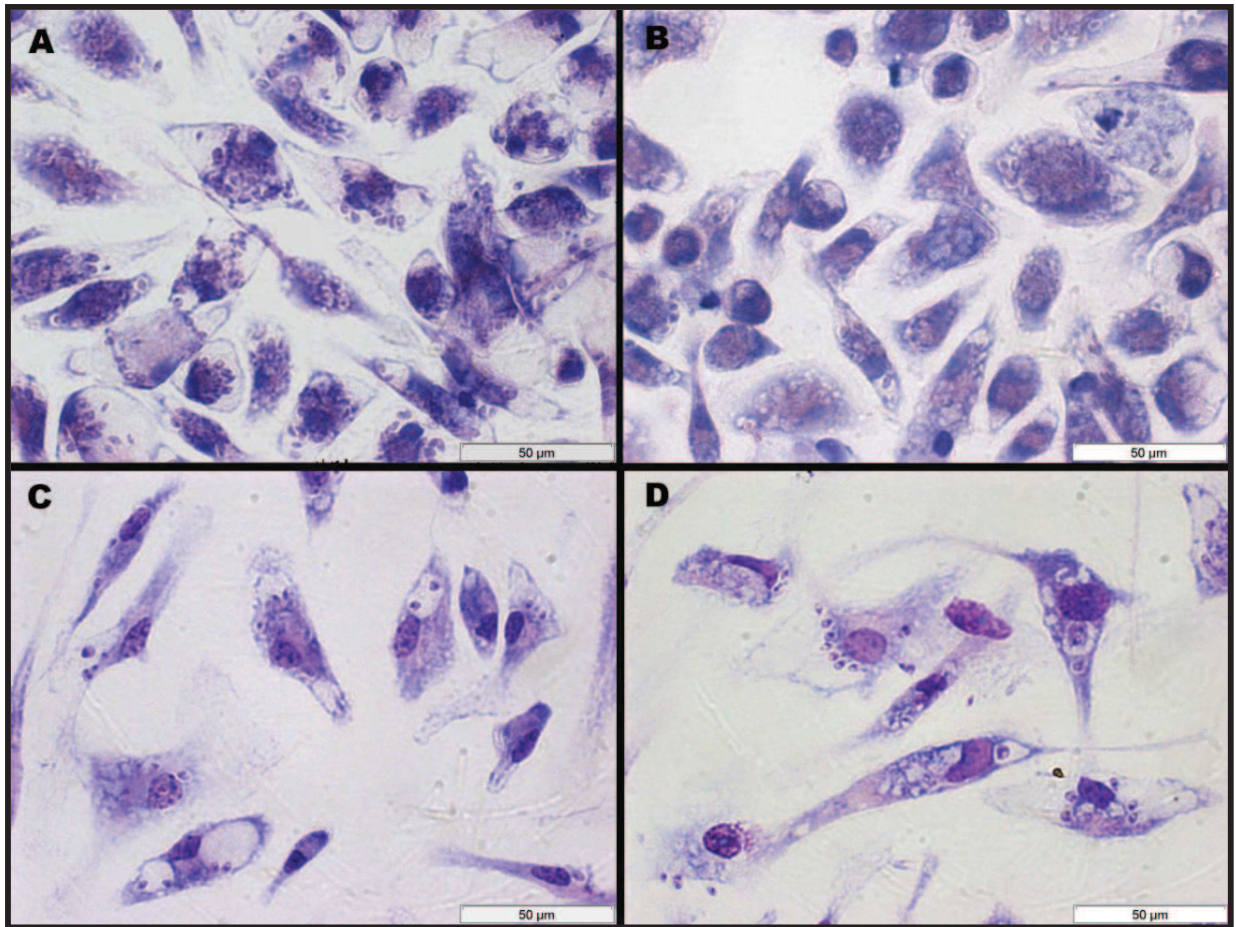
Os macrófagos de C3H/He apresentaram uma baixa produção de TNF quando comparados com os dos BALB/c, sendo esta produção detectável somente a partir das 48 horas tanto no controle quanto no infectado. As células de BALB/c apresentaram os maiores níveis desta citocina em todos os tempos após a infecção, ao passo que as células de C57BL/10 mostraram níveis intermediários, significativamente inferiores ao de BALB/c 24 e 96h após a infecção. (Figura 4.9A B). Somente macrófagos de camundongos BALB/c mostraram diferença de produção da citocina (96h) quando comparados o controle com o infectado (Figura 4.9C)

## Resultados

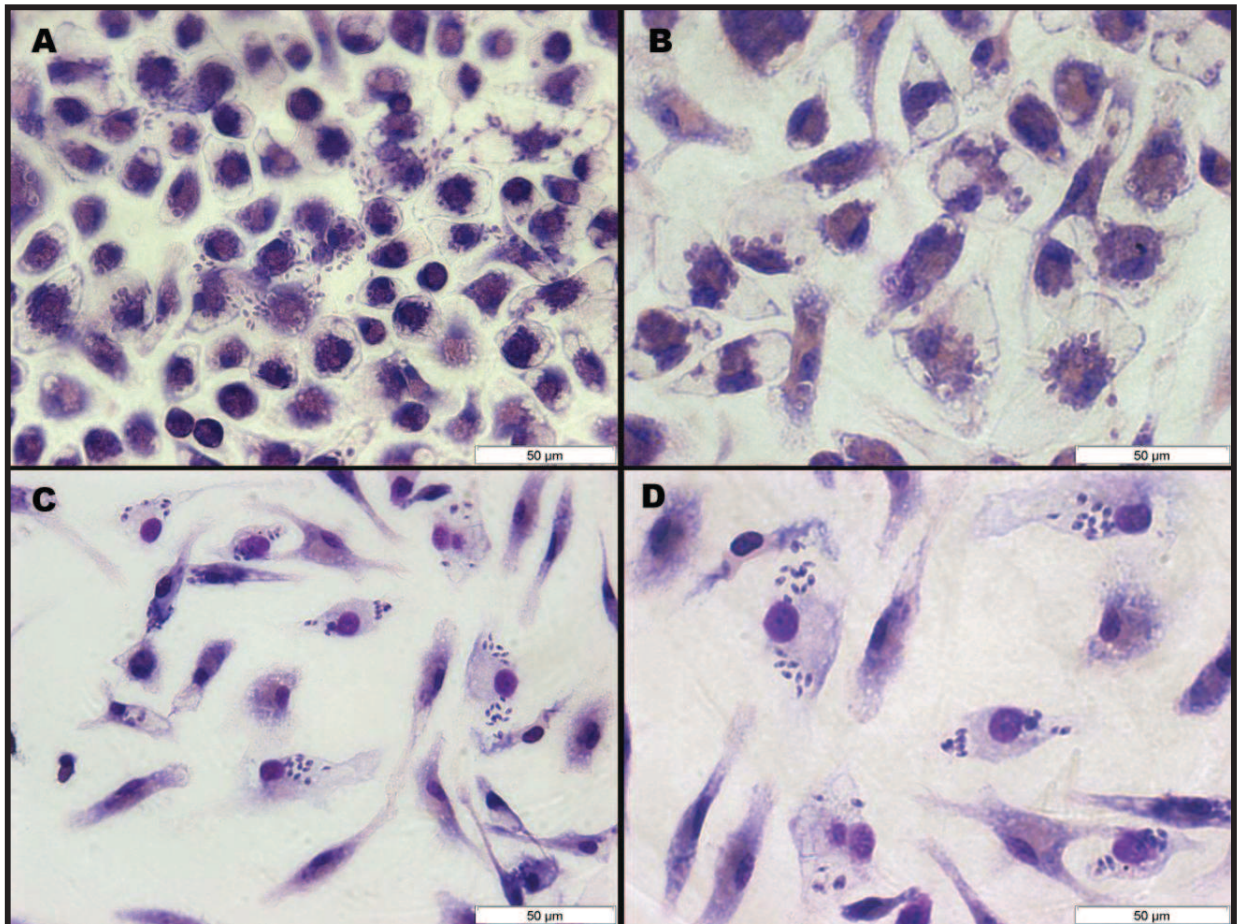
---

A produção da citocina IL-10 foi maior em macrófagos C3H/He quando comparados a macrófagos BALB/c e C57BL/10 independente do tempo da infecção tanto nos controles quanto nos infectados, tendo sido significativamente aumentada 24 e 72 horas após a infecção (Figura 4.10 A,B e C).

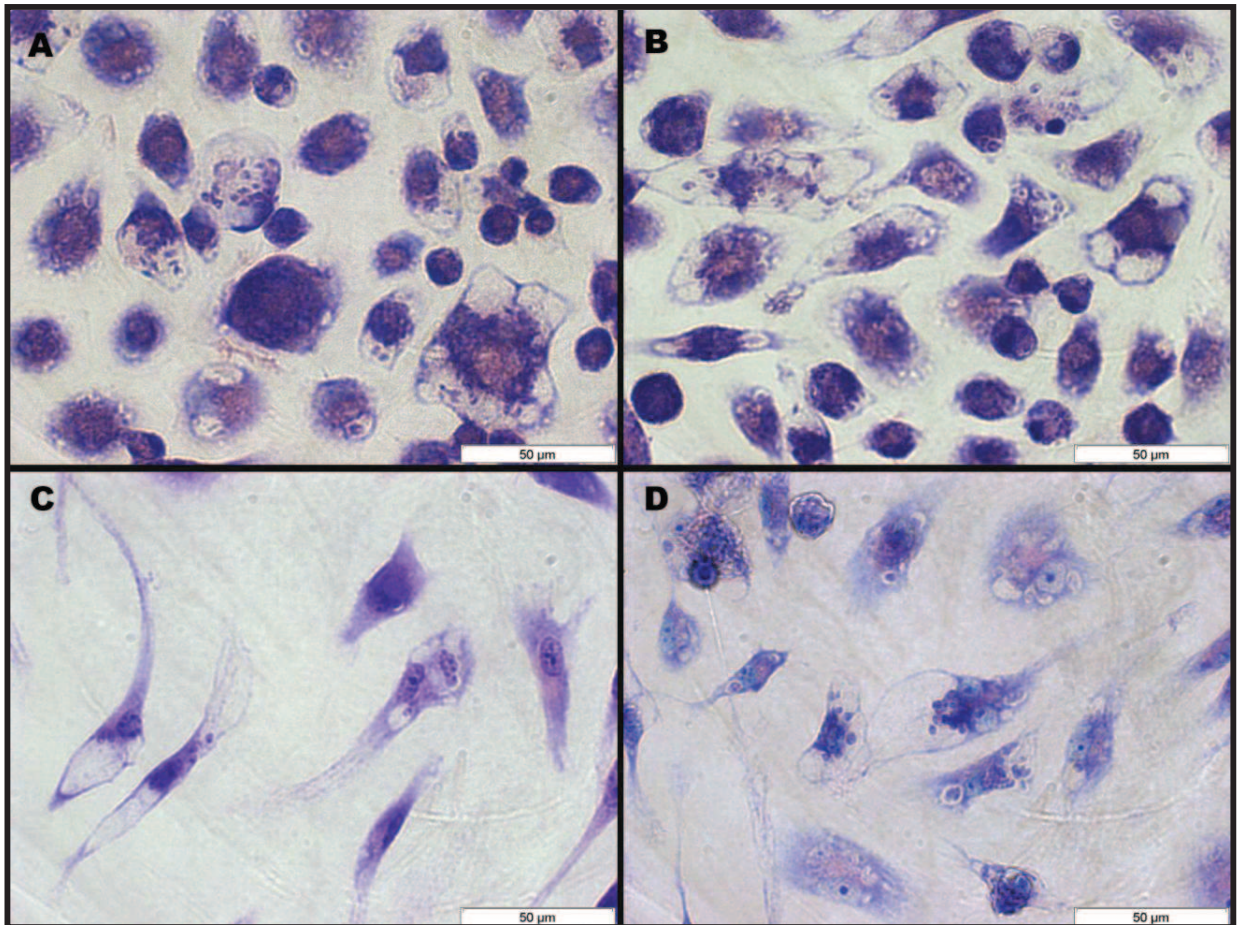
Resumindo, a dosagem de citocinas no sobrenadante das culturas mostrou que de modo geral, os macrófagos de todas as três linhagens produziram citocinas em níveis baixos, com algumas exceções, independente de estarem infectados ou não. Ainda olhando os resultados como um todo, as células de origem C57BL/10 apresentaram a menor produção de citocinas. Os macrófagos de origem C3H/He apresentaram altos níveis de IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-10, sendo este último exacerbado pela infecção. Finalmente, as células de animais BALB/c apresentaram produção baixa a moderada de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-12, sendo os dois últimos levemente aumentados pela infecção. Não foi possível detectar produção de IL-6 por nenhuma das linhagens estudadas.



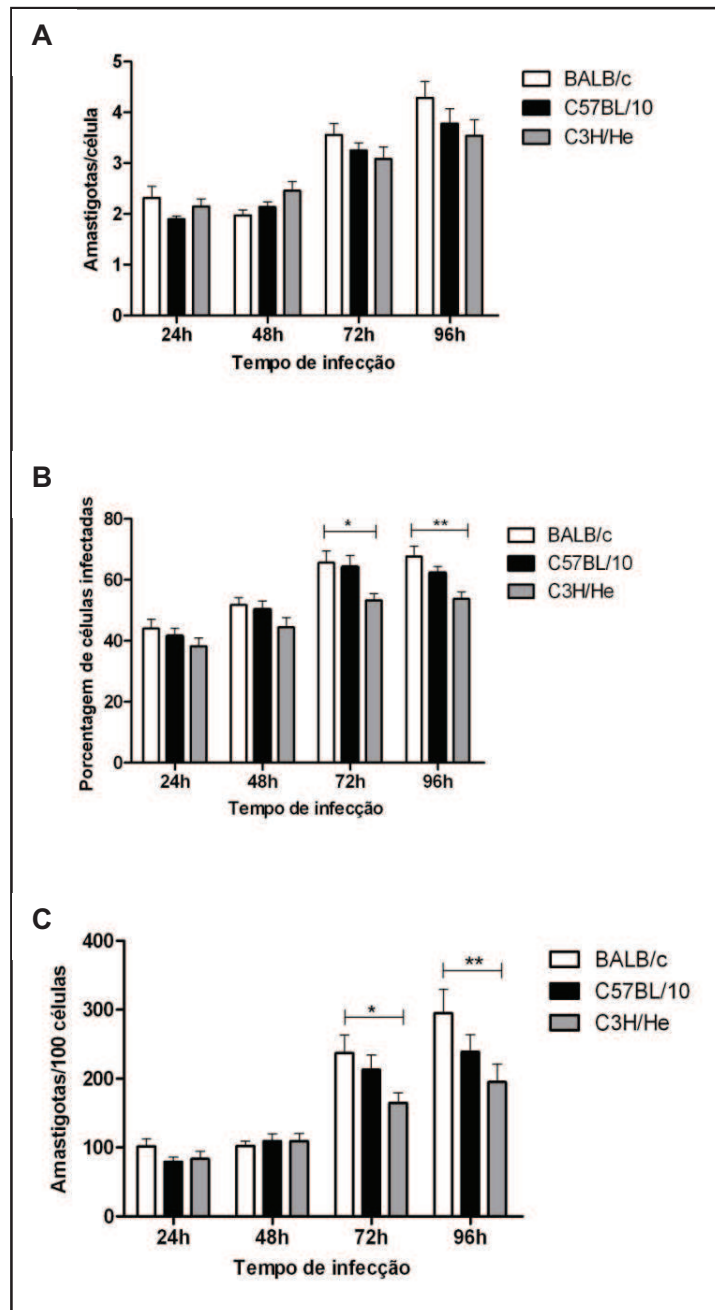
**Figura 4.1** Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis*. **A)** Concentração de  $1 \times 10^6$  células para  $2 \times 10^6$  de *L. amazonensis*. **B)** Concentração de  $1 \times 10^6$  células para  $5 \times 10^6$  de *L. amazonensis*. **C)** Concentração de  $2 \times 10^5$  células para  $4 \times 10^5$  de *L. amazonensis*. **D)** Concentração de  $2 \times 10^5$  células para  $1 \times 10^6$  de *L. amazonensis*. Todas as células coradas por Giemsa.



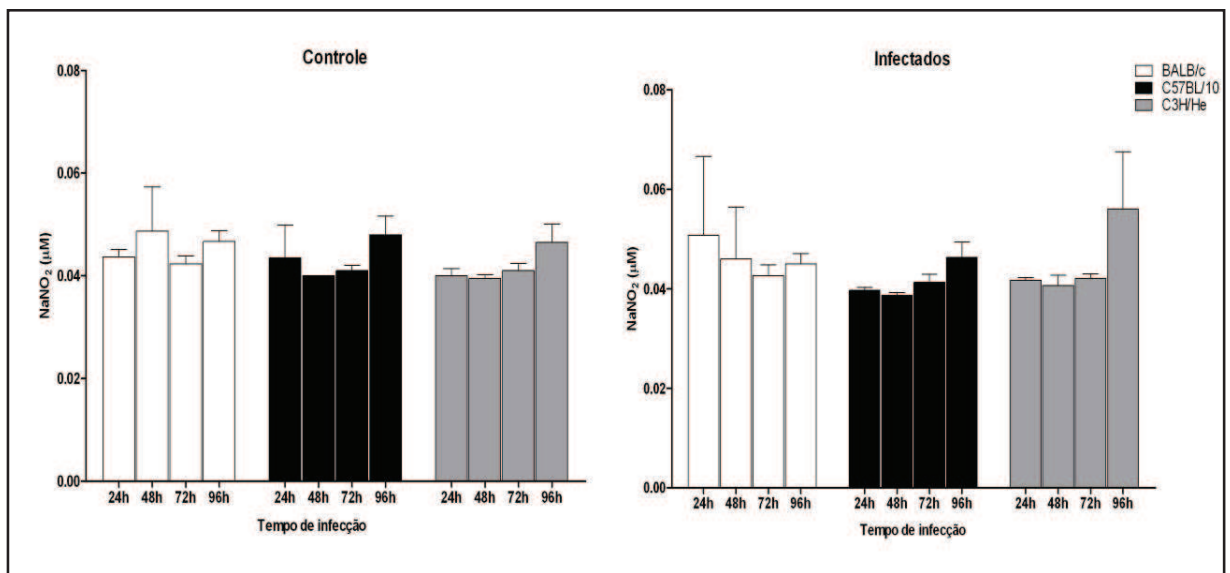
**Figura 4.2.** Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/10 infectados por *L. amazonensis*. **A)** Concentração de  $1 \times 10^6$  células para  $2 \times 10^6$  de *L. amazonensis*. **B)** Concentração de  $1 \times 10^6$  células para  $5 \times 10^6$  de *L. amazonensis*. **C)** Concentração de  $2 \times 10^5$  células para  $4 \times 10^5$  de *L. amazonensis*. **D)** Concentração de  $2 \times 10^5$  células para  $1 \times 10^6$  de *L. amazonensis*. Todas as células coradas por Giemsa.



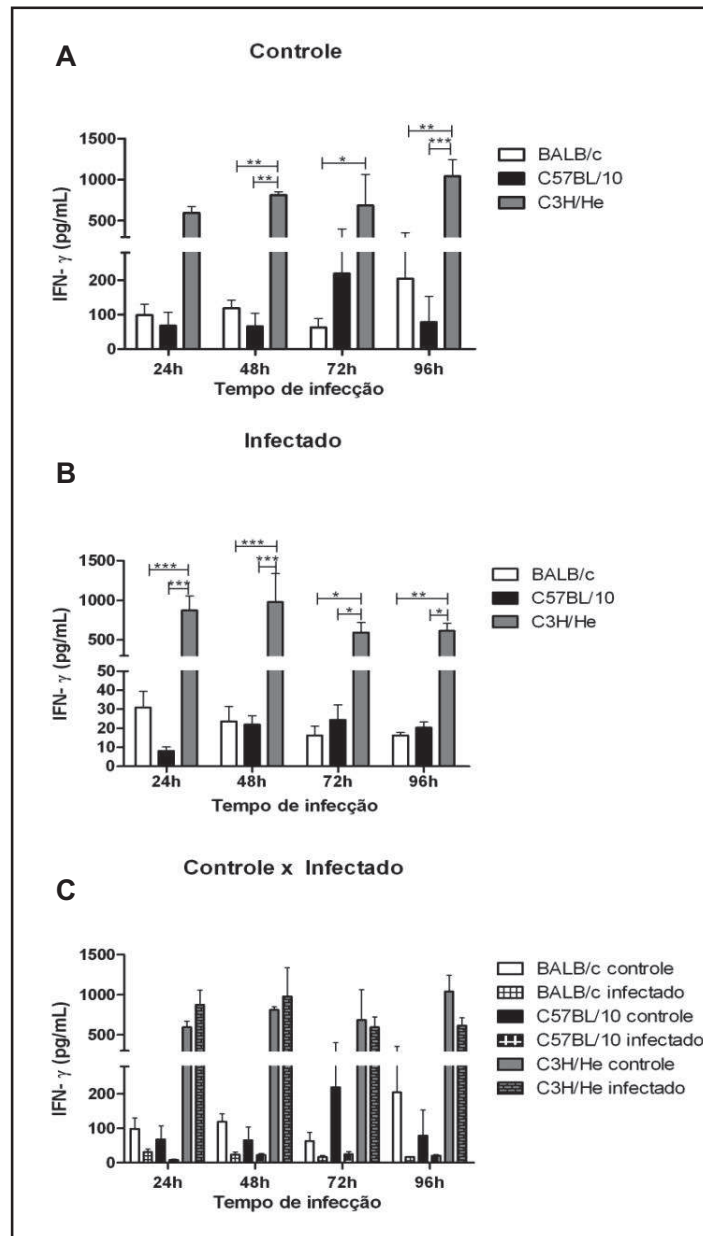
**Figura 4.3.** Macrófagos peritoneais de camundongos C3H/He infectados por *L. amazonensis*. **A)** Concentração de  $1 \times 10^6$  células para  $2 \times 10^6$  de *L. amazonensis*. **B)** Concentração de  $1 \times 10^6$  células para  $5 \times 10^6$  de *L. amazonensis*. **C)** Concentração de  $2 \times 10^5$  células para  $4 \times 10^5$  de *L. amazonensis*. **D)** Concentração de  $2 \times 10^5$  células para  $1 \times 10^6$  de *L. amazonensis*. Todas as células coradas por Giemsa.



**Figura 4.4** Contagem amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais infectados por *L. amazonensis*. **A)** Média de amastigota por célula **B)** Porcentagem de células infectadas **C)** Quantidade de amastigotas por 100 células (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ . Two-way ANOVA pós-teste Bonferroni).

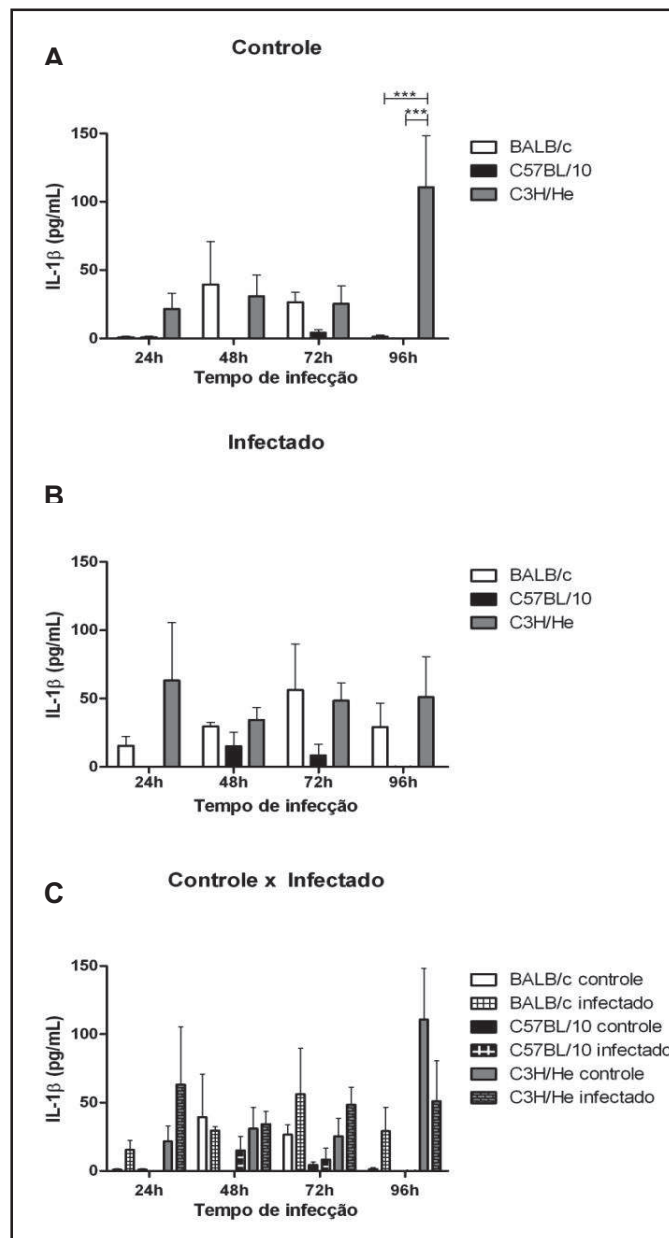


**Figura 4.5.** Dosagem de nitrito em macrófagos peritoneais infectados ou não por *L. amazonensis*. Two-Way ANOVA pós-teste Bonferroni

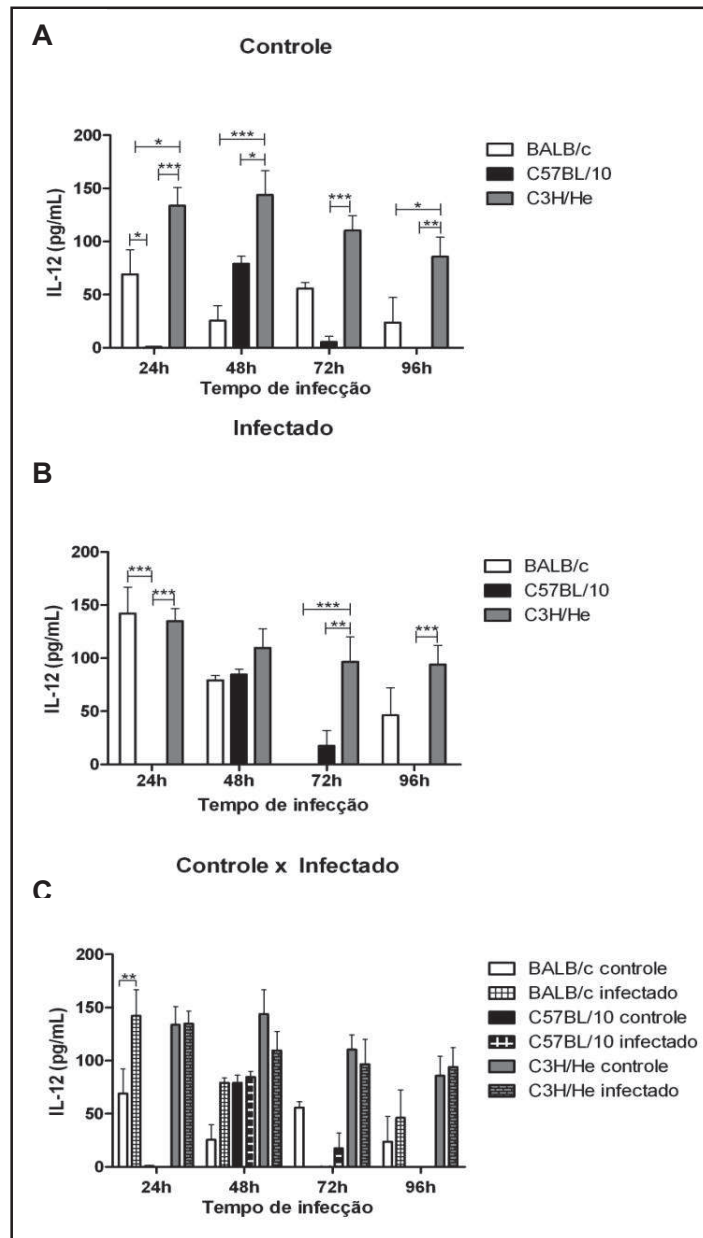


**Figura 4.6** Produção de IFN- $\gamma$  por macrófagos peritoneais infectados ou não por *L. amazonensis*. **A)** Comparação da concentração de IFN- $\gamma$  entre as linhagens em macrófagos não infectados (controle) **B)** Comparação da concentração de IFN- $\gamma$  entre as linhagens em macrófagos infectados **C)** Diferença entre controle e infectado de cada linhagem (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  Two-way ANOVA pós-teste Bonferroni)

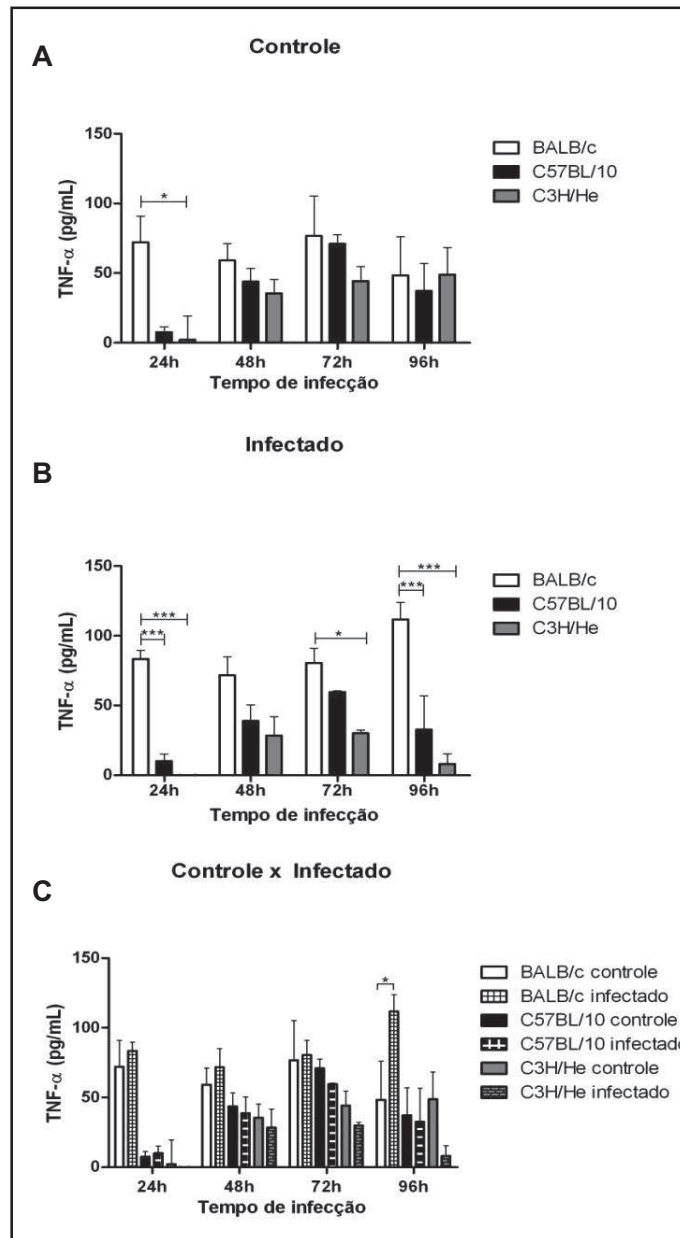




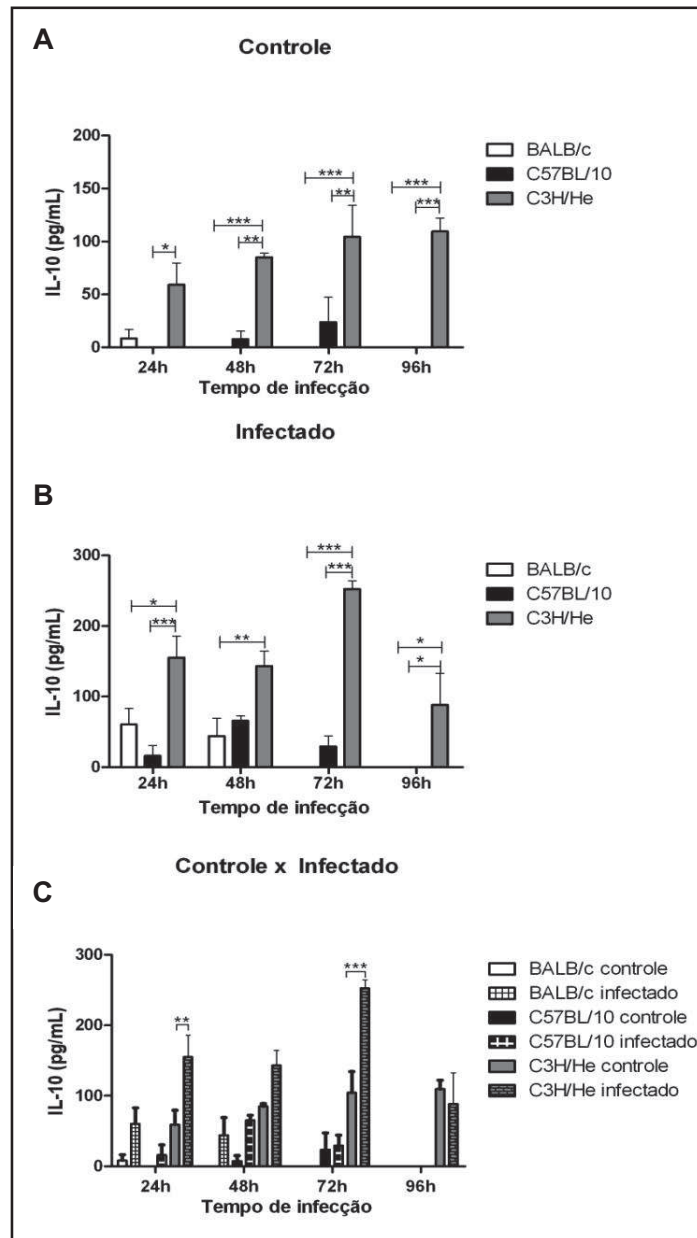
**Figura 4.7** Produção de IL-1 $\beta$  por macrófagos peritoneais infectados ou não por *L. amazonensis*. **A)** Comparação da concentração de IL-1 $\beta$  entre as linhagens em macrófagos não infectados (controle) **B)** Comparação da concentração de IL-1 $\beta$  entre as linhagens em macrófagos infectados **C)** Diferença entre controle e infectado de cada linhagem (\*\*\*) $p < 0.001$  Two-way ANOVA pós-teste Bonferroni)



**Figura 4.8** Produção de IL-12 por macrófagos peritoneais infectados ou não por *L. amazonensis* **A)** Comparação da concentração de IL-12 entre as linhagens em macrófagos não infectados (controle) **B)** Comparação da concentração de IL-12 entre as linhagens em macrófagos infectados **C)** Diferença entre controle e infectado de cada linhagem (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  Two-way ANOVA pós-teste Bonferroni)



**Figura 4.9** Produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais infectados ou não por *L. amazonensis*. **A)** Comparação da concentração de TNF- $\alpha$  entre as linhagens em macrófagos não infectados (controle) **B)** Comparação da concentração de TNF- $\alpha$  entre as linhagens em macrófagos infectados **C)** Diferença entre controle e infectado de cada linhagem (\* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$  Two-way ANOVA pós-teste Bonferroni)



**Figura 4.10** Produção de IL-10 por macrófagos peritoneais infectados ou não por *L. amazonensis*. **A)** Comparação da concentração de IL-10 entre as linhagens em macrófagos não infectados (controle) **B)** Comparação da concentração de IL-10 entre as linhagens em macrófagos infectados **C)** Diferença entre controle e infectado de cada linhagem (\* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$  Two-way ANOVA pós-teste Bonferroni)

### 4.3 Padronização do LPS

Como a produção de NO pelos macrófagos foi muito baixa e não observamos diferença entre as linhagens, decidimos estimular as células de modo a exacerbar esta produção e tentar observar diferenças de produção. A estimulação foi feita sempre 6 horas após a infecção de modo a não interferir no contato inicial entre a célula e o parasito.

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/10 produziram altos níveis de nitrito respondendo de forma dose dependente ao estímulo por LPS. Porém, os macrófagos peritoneais de camundongos C3H/He não responderam ao estímulo por LPS, independente da dose utilizada (Figura 4.11) Com base nestes resultados resolvemos trabalhar com a dose de 5µg de LPS.

### 4.4 Padronização do interferon-gama (IFN-γ)

Como os macrófagos de origem C3H/He não responderam ao estímulo por LPS decidimos utilizar uma dupla estimulação, adicionando no mesmo momento IFN-γ. Pode-se observar que os macrófagos de todas as linhagens do estudo responderam eficientemente aos estímulos por LPS e IFN-γ, produzindo altos níveis de nitrito. A resposta não foi dose dependente e por isso escolhemos trabalhar com a menor dose ensaiada, isto é 2ng/mL (Figura 4.12).

### 4.5 Protocolos com estímulo

#### 4.5.1 Avaliação da carga parasitária intracelular e taxa de infecção de macrófagos

Quando os macrófagos das diferentes linhagens foram estimulados por LPS e IFN-γ, não se observou qualquer diferença na média de amastigotas por célula, a não ser um aumento na média de BALB/c às 72h, após a infecção (Figura 4.13 A). A taxa de infecção sugeriu um menor número de células infectadas nos macrófagos de origem C3H/He 96h após a infecção, mas a diferença não foi estatisticamente significativa. Quando calculamos a carga parasitária total, esta diferença se tornou mais evidente e significativamente menor do que a carga total dos macrófagos de origem BALB/c

## Resultados

---

(Figura 4.13 B e C). Observamos ainda que a estimulação por LPS e IFN- $\gamma$  foi capaz de reduzir a carga parasitária total em todas as linhagens, quando comparado com a infecção de macrófagos não estimulados ( $p < 0,001$ ) (dado não mostrado).

### 4.5.2 Avaliação da produção de óxido nítrico

A dosagem de nitrito mostrou que os macrófagos de origem BALB/c de modo geral produziram menos NO do que os C3H/He e C57BL/10. As células C3H/He não infectadas tiveram uma produção maior do que as células de origem C57BL/10 a partir de 72h após a infecção. Estas, no entanto, apresentaram produção de NO equivalente a do C3H/He quando infectadas (Figura 4.14). Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas na produção de NO entre as células infectadas e não infectadas de mesma origem, com exceção do ponto de 96h em que os macrófagos controles de BALB/c e C3H/He produziram mais nitrito do que os infectados (Figura 4.15).

### 4.5.3 Dosagem de citocinas

Quando os macrófagos peritoneais de BALB/c foram estimulados por LPS e IFN- $\gamma$ , a produção de IL-1 $\beta$  foi fortemente aumentada. O mesmo não aconteceu com as células de C3H/He, onde não foi possível detectar a citocina. Já os macrófagos de C57BL/10, mostraram um leve aumento na produção, porém esta se manteve significativamente inferior a do BALB/c (Figuras 4.16A e B). Não foi possível observar diferenças significativas na produção de IL-1 $\beta$  entre células controle e infectadas (Figura 4.16C).

A produção da citocina IL-12 também foi intensamente aumentada nos macrófagos BALB/c e C57BL/10, porém não nas células de origem C3H/He, nos quais não foi possível detectar IL-12 nos macrófagos infectados (Figuras 4.17A e B). Em todos os tempos foi possível observar uma redução significativa de IL-12 nos macrófagos infectados de BALB/c e C57BL/10, em relação a seus controles (Figura 4.17C).

A estimulação por LPS e IFN- $\gamma$  foi capaz de aumentar a produção de TNF- $\alpha$  nos macrófagos das três linhagens estudadas, sendo essa produção inversamente

**Pereira, SS**

---

## Resultados

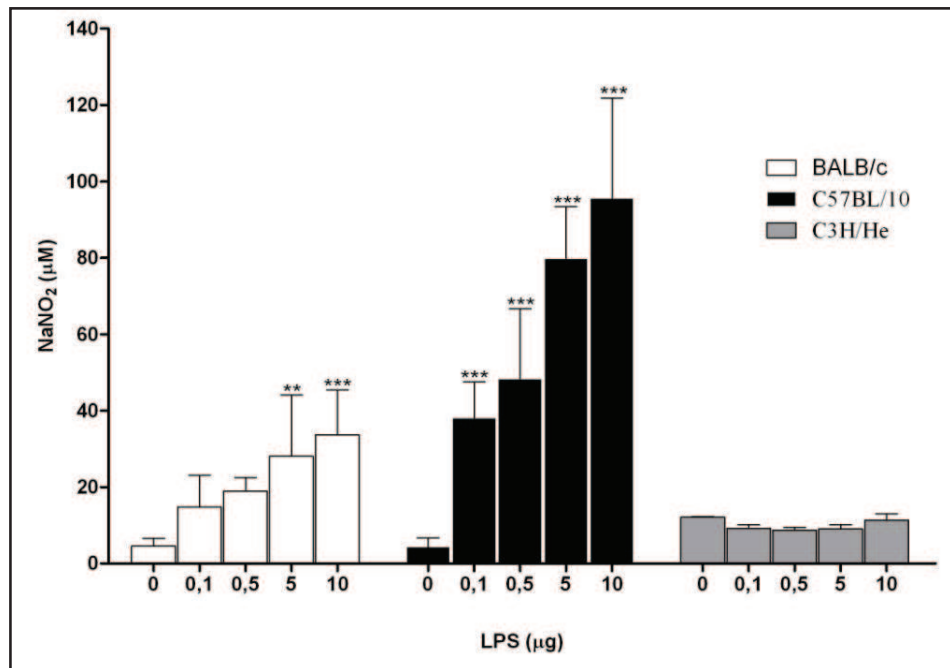
---

proporcional ao tempo de cultura, tanto nas células infectadas quanto nos controles. Macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/10 produziram TNF- $\alpha$  em maiores quantidades do que macrófagos C3H/He (Figuras 4.18A.e B) Houve um aumento de produção nas células infectadas de C57BL/10 no início da infecção e de BALB/c nos tempos mais tardios, sempre em relação ao controle não infectado (Figura 4.18C).

A produção de IL-10 nas células de C57BL/10 foi extremamente aumentada pelo estímulo pró-inflamatório, sendo essa produção muito superior a dos macrófagos de BALB/c e C3H/He. Este último mostrou produção praticamente indetectável em todos os tempos de cultura (Figura 4.19A, B e C).

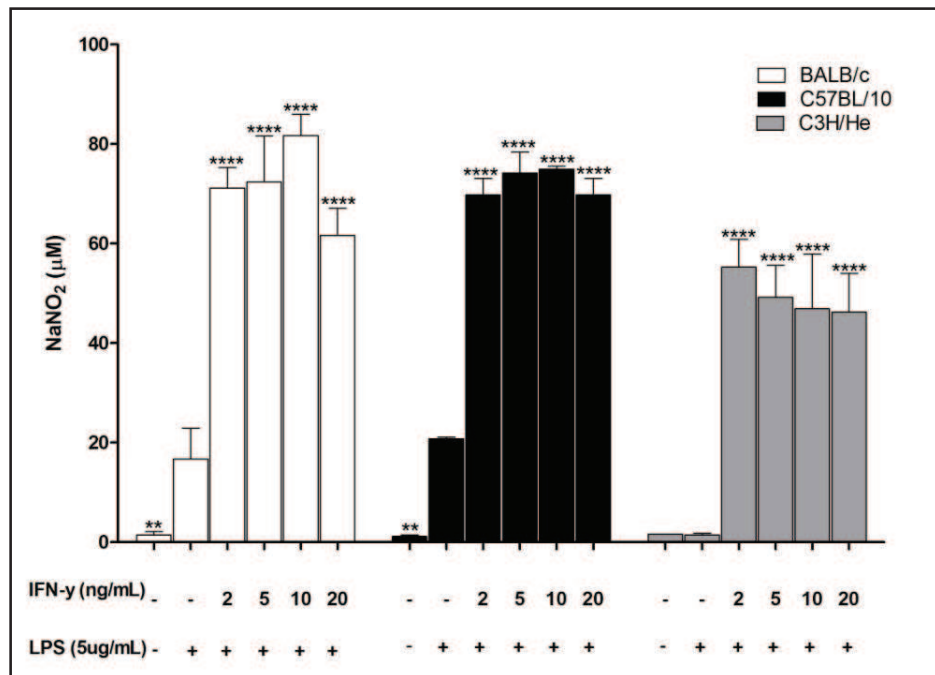
Quando estimulados, macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/10 produziram altos níveis da citocina IL-6 quando comparados com macrófagos de camundongos C3H/He (Figuras 4.20A e B) Somente foi possível visualizar diferença na produção entre macrófagos controle e infectado nos macrófagos C3H/He nos tempos de 72 e 96 horas de infecção (Figura 4.20C).

De modo geral, os macrófagos de BALB/c e C57BL/10 responderam melhor ao estímulo de LPS e IFN- $\gamma$ , aumentando sua produção de citocinas. Já as células de origem C3H/He quando estimuladas mostraram pouca ou nenhuma produção de IL-1 $\beta$ , IL12 e IL-10 e uma estimulação de TNF e IL-6 ,porém em níveis inferiores a das outras linhagens.

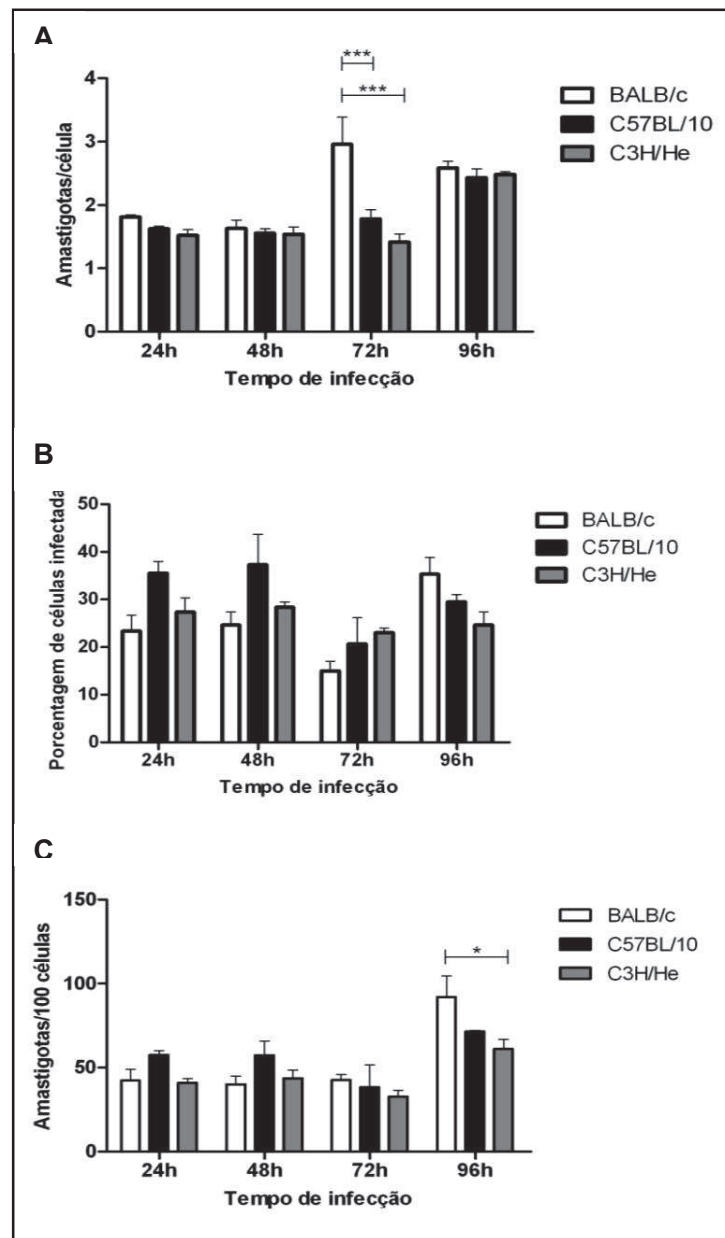


**Figura 4.11.** Padronização da concentração de LPS. Dosagem de nitrito em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, C57BL/10 e C3H/He não-infectados após 72 horas do estímulo por LPS. A estatística foi realizada em relação aos macrófagos não estimulados por LPS. (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  Two-way ANOVA pós-teste Bonferroni)

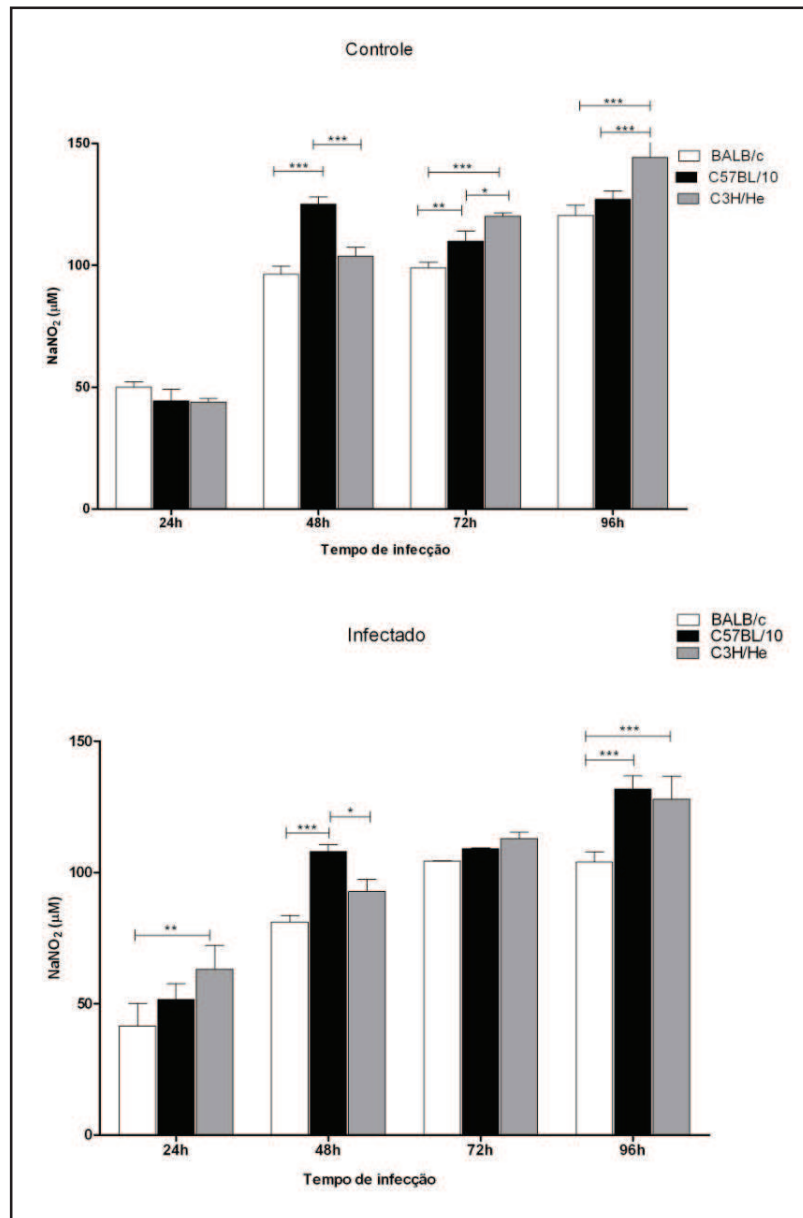




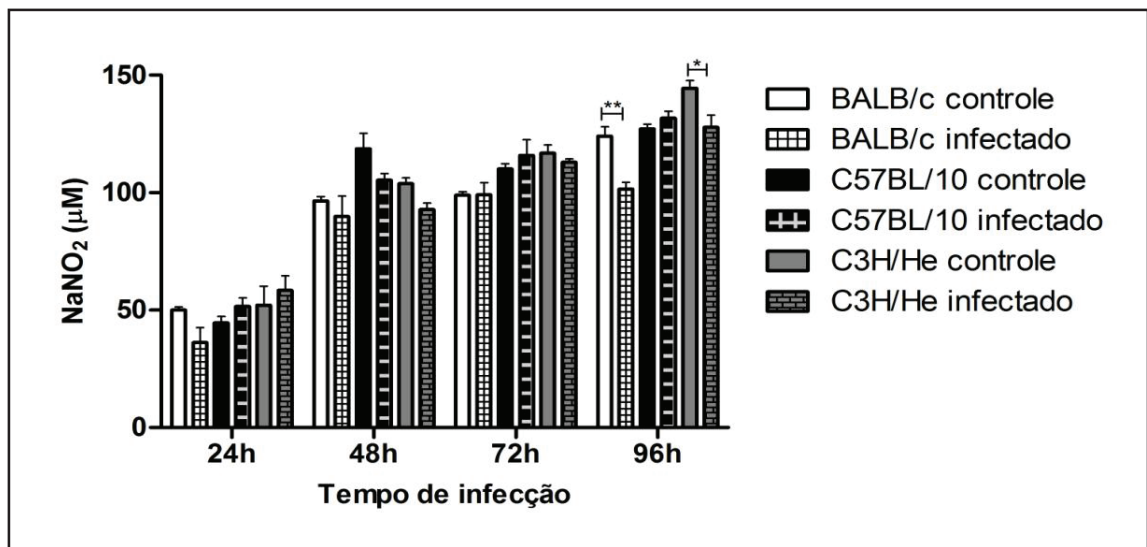
**Figura 4.12.** Padronização da concentração de IFN- $\gamma$ . Dosagem de nitrito em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, C7BL/10 e C3H/He não-infectados após 72 horas do estímulo por IFN- $\gamma$  e LPS. A estatística foi realizada em relação aos macrófagos estimulados somente por LPS. (\*\* $p < 0.01$  \*\*\*\*  $p < 0.0001$  Two-way ANOVA pós-teste Bonferroni.).



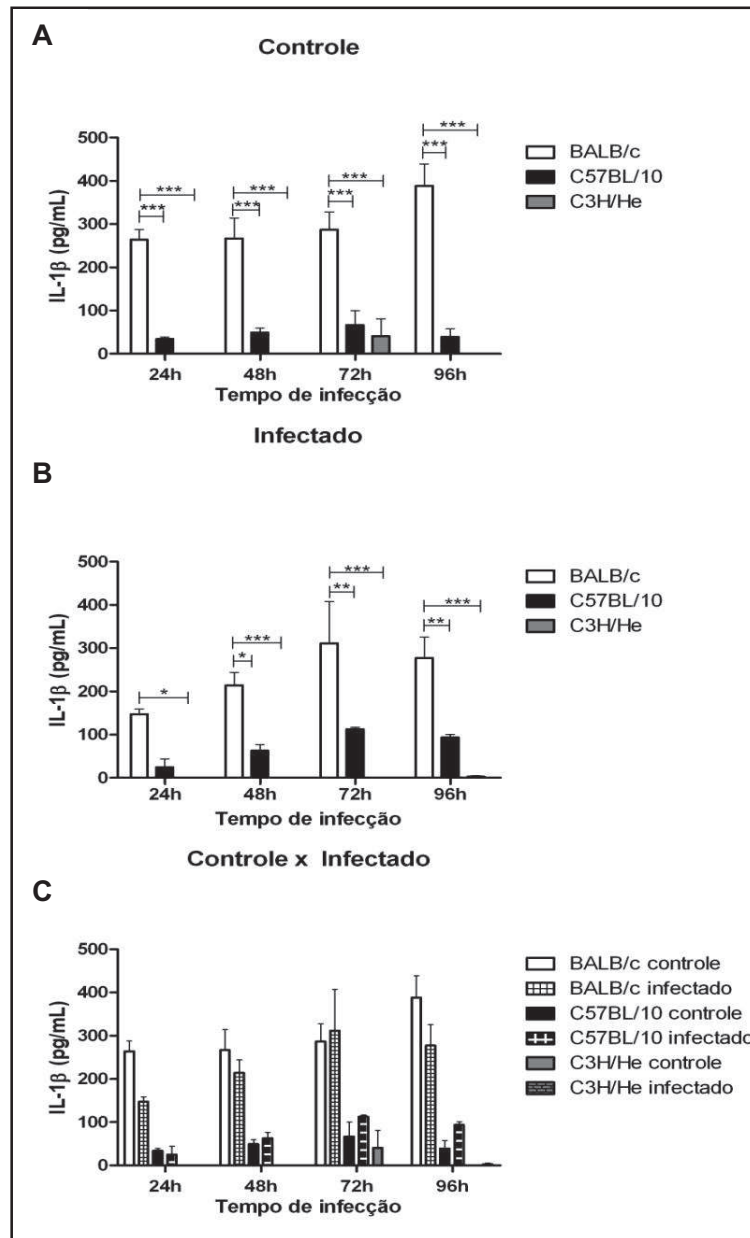
**Figura 4.13** Contagem de amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais infectados por *L. amazonensis* e estimulados por LPS (5µg/mL) e IFN-γ (2ng/mL) **A)** Média de amastigota por célula **B)** Porcentagem de células infectadas **C)** Quantidade de amastigotas por 100 células. (\* p<0.05; \*\*\* p<0.001 Two-way ANOVA pós-teste Bonferroni).



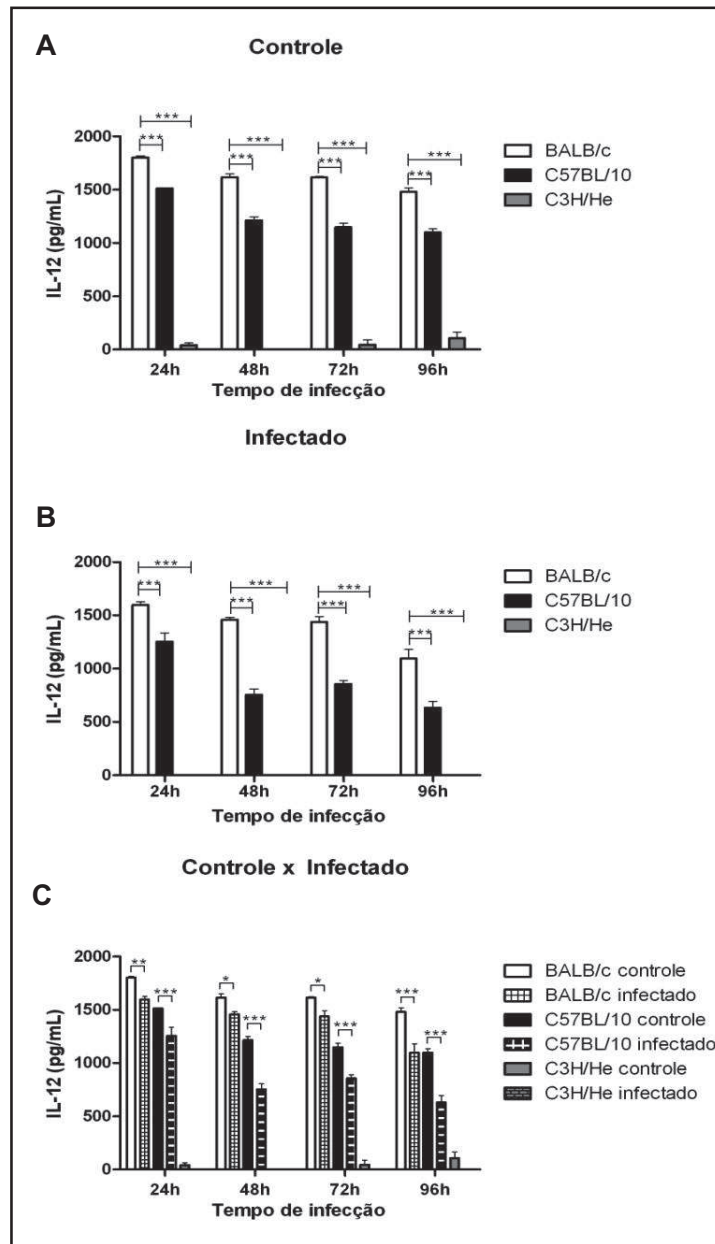
**Figura 4.14.** Dosagem de nitrito em macrófagos peritoneais estimulados infectados ou não por *L. amazonensis* por IFN- $\gamma$  e LPS nítrico. Sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais das três linhagens infectados por *L. amazonensis* (2 MOI) e estimulados por IFN- $\gamma$  (2ng/mL) e LPS (5 $\mu$ g/mL) após seis horas de infecção. (\* p<0.05 \*\* p<0.01 \*\*\*p<0.001 Two-way ANOVA. pós-teste Bonferroni).



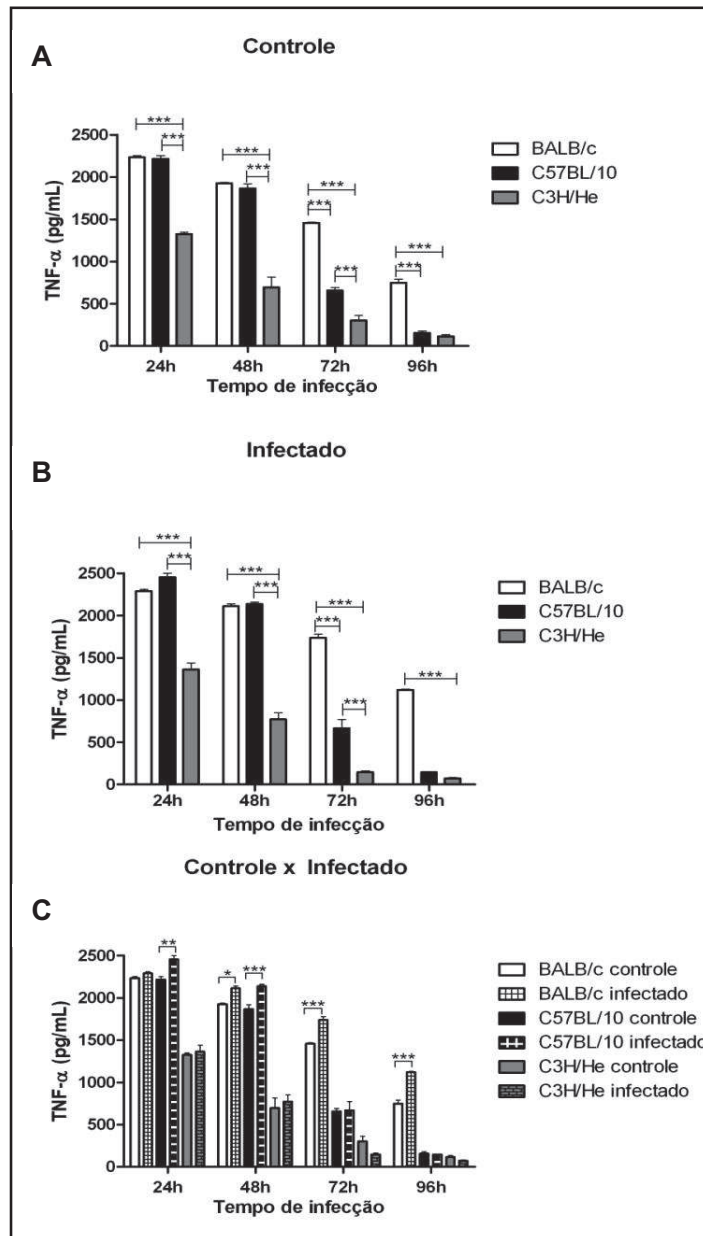
**Figura 4.15.** Dosagem de nitrito em macrófagos peritoneais estimulados infectados ou não por *L. amazonensis* por IFN- $\gamma$  e LPS. Sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais das três linhagens infectados por *L. amazonensis* (2 MOI) e estimulados por IFN- $\gamma$  (2ng/mL) e LPS (5 $\mu$ g/mL) após seis horas de infecção (\*p<0.05 \*\* p<0.01 Two-way ANOVA. pós-teste Bonferroni).



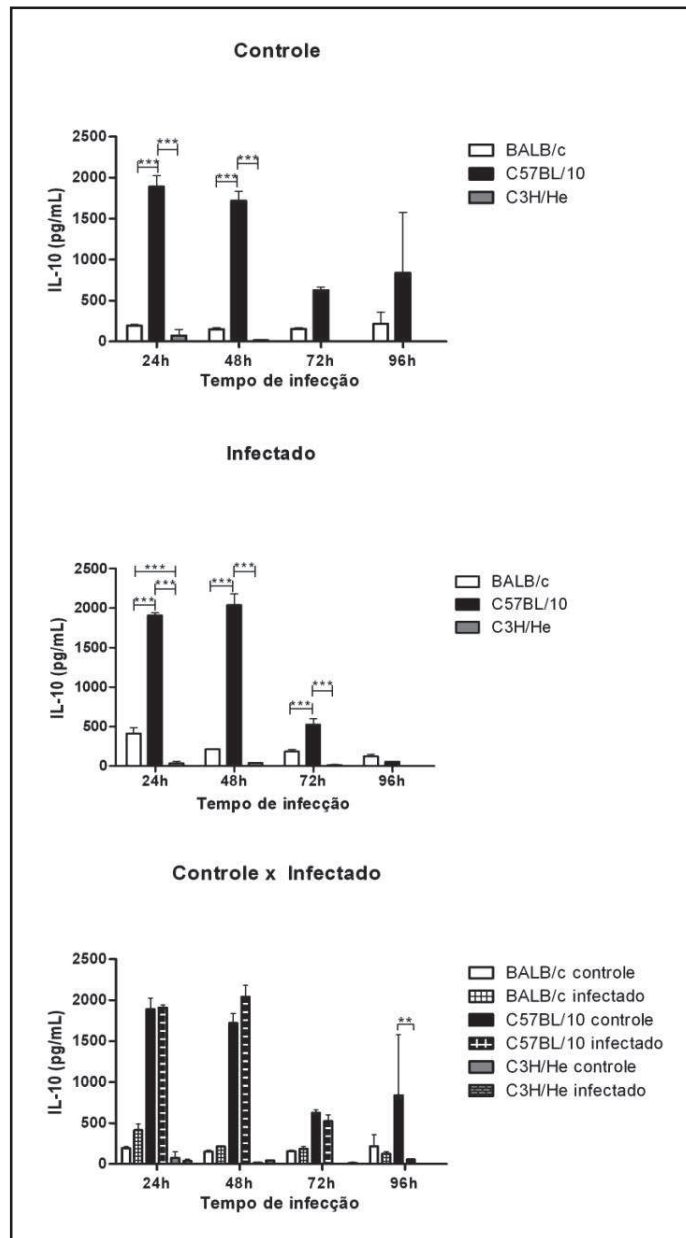
**Figura 4.16** Produção de IL-1 $\beta$  por macrófagos peritoneais infectados ou por *L. amazonensis* estimulados por LPS (5 $\mu$ g/mL) e IFN- $\gamma$  (2ng/mL) **A)** Comparação da concentração de IL-1 $\beta$  entre as linhagens em macrófagos não infectados (controle) **B)** Comparação da concentração de IL-1 $\beta$  entre as linhagens em macrófagos infectados **C)** Diferença entre controle e infectado de cada linhagem (\*p<0.05, \*\*p<0.01;\*\*\*p<0.001 Two-way ANOVA pós- teste Bonferroni)



**Figura 4.17** Produção de IL-12 por macrófagos peritoneais infectados ou por *L. amazonensis* estimulados por LPS (5µg/mL) e IFN-γ (2ng/mL) **A)** Comparação da concentração de IL-12 entre as linhagens em macrófagos não infectados (controle) **B)** Comparação da concentração de IL-12 entre as linhagens em macrófagos infectados **C)** Diferença entre controle e infectado de cada linhagem (\*p<0.05, \*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001 Two-way ANOVA pós- teste Bonferroni)

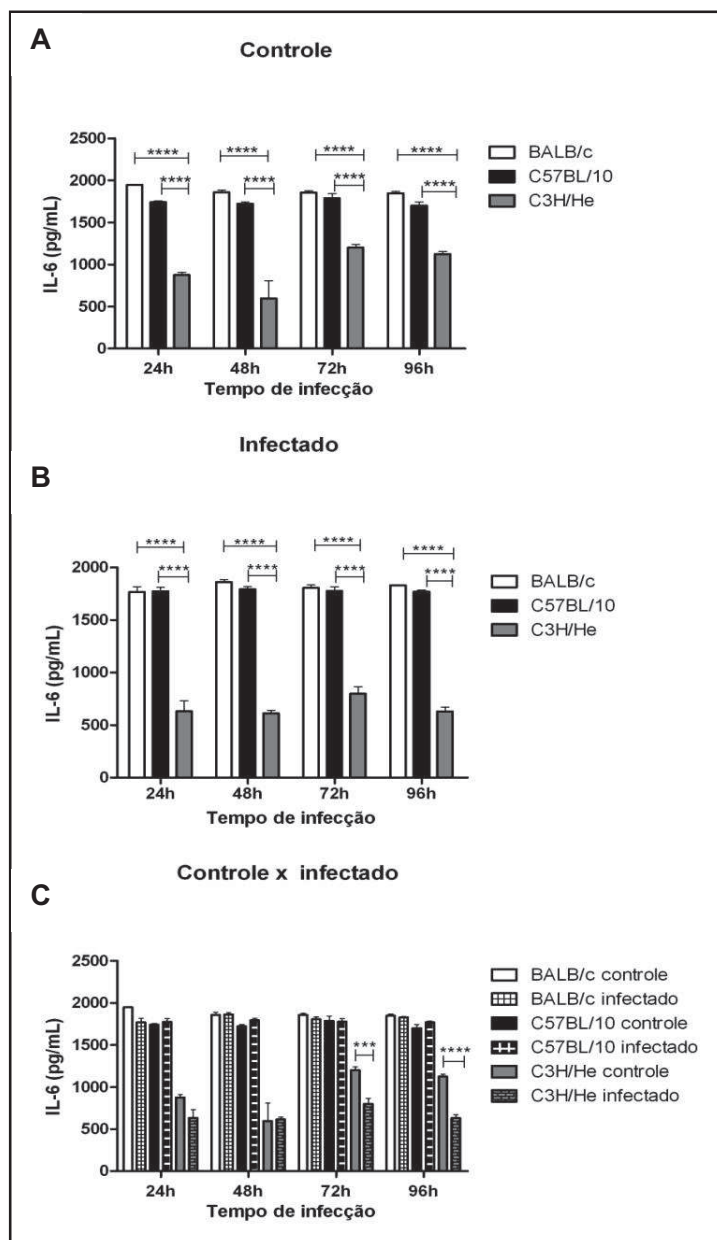


**Figura 4.18** Produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais infectados ou por *L. amazonensis* estimulados por LPS (5 $\mu$ g/mL) e IFN- $\gamma$  (2ng/mL) **A)** Comparação da concentração de TNF- $\alpha$  entre as linhagens em macrófagos não infectados (controle) **B)** Comparação da concentração de TNF- $\alpha$  entre as linhagens em macrófagos infectados **C)** Diferença entre controle e infectado de cada linhagem (\*p<0.05, \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 Two-way ANOVA pós-teste Bonferroni)



**Figura 4.19** Produção de IL-10 por macrófagos peritoneais infectados ou por *L. amazonensis* estimulados por LPS (5µg/mL) e IFN-γ (2ng/mL) **A)** Comparação da concentração de IL-10 entre as linhagens em macrófagos não infectados (controle) **B)** Comparação da concentração de IL-10 entre as linhagens em macrófagos infectados **C)** Diferença entre controle e infectado de cada linhagem (\*\*p<0.01;\*\*\*p<0.001 Two-way ANOVA pós- teste Bonferroni)





**Figura 4.20** Produção de IL-6 por macrófagos peritoneais infectados ou por *L. amazonensis* estimulados por LPS (5µg/mL) e IFN-γ (2ng/mL) **A)** Comparação da concentração de IL-6 entre as linhagens em macrófagos não infectados (controle) **B)** Comparação da concentração de IL-6 entre as linhagens em macrófagos infectados **C)** Diferença entre controle e infectado de cada linhagem (\*\*p<0.001;\*\*\*\*p<0.0001 Two-way ANOVA pós- teste Bonferroni).

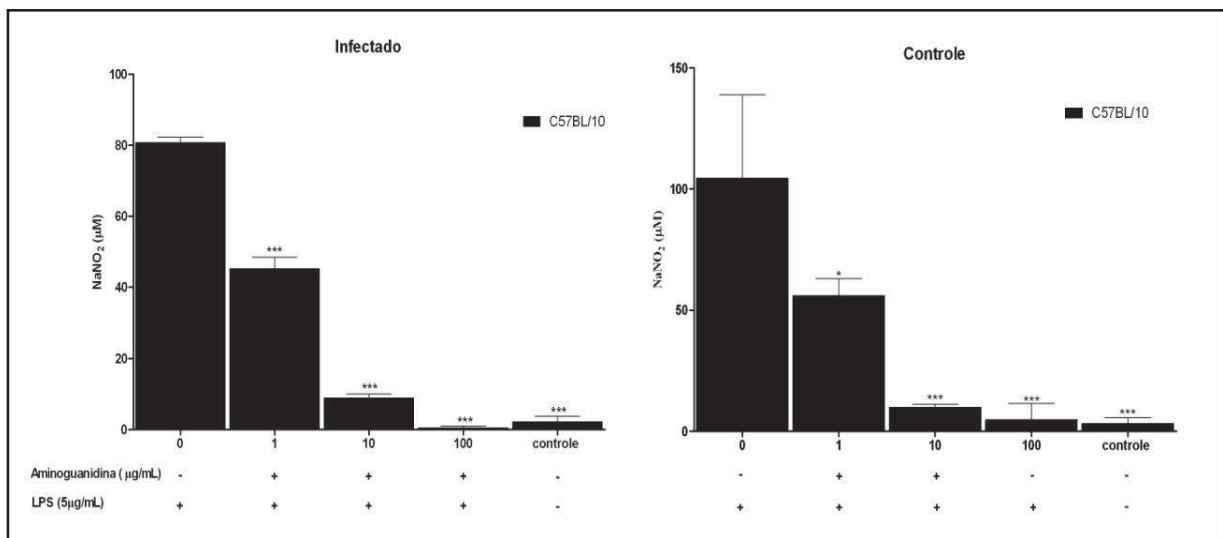
### **4.6 Padronização aminoguanidina**

A padronização da dose ideal de aminoguanidina foi feita pela dosagem de nitrito em culturas de macrófagos de C57BL/10. Foi possível observar inibição da produção de NO de maneira dose dependente da aminoguanidina, em que 100µg/mL de aminoguanidina inibiram de forma eficaz a ação da iNOS (Figura 4.21).

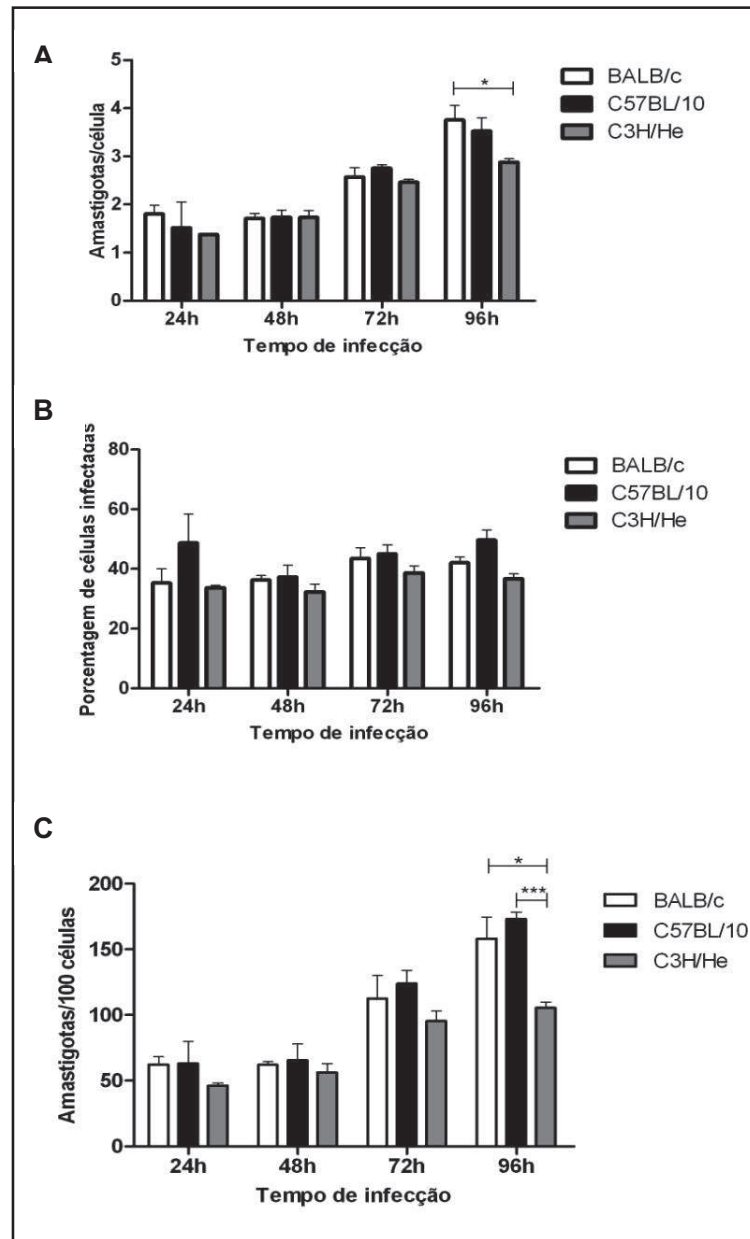
### **4.7 Protocolos de inibição da iNOS**

#### **4.7.1 Avaliação da carga parasitária intracelular e da taxa de infecção dos macrófagos**

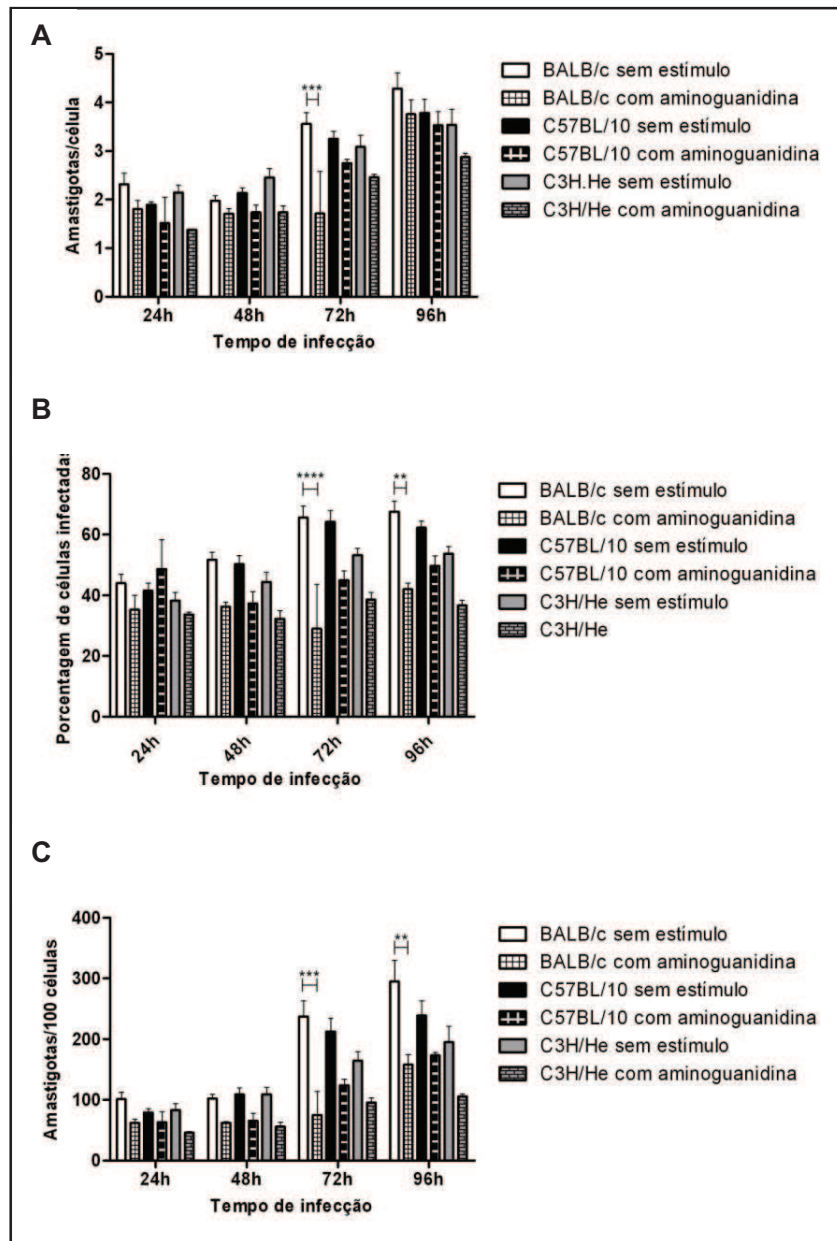
Nas culturas tratadas com aminoguanidina, os macrófagos de camundongos C3H/He apresentam menor quantidade de amastigotas por célula quando comparados com os BALB/c 96h após a infecção (Figura 4.22A). Essa diferença é acentuada quando calculamos a carga parasitária total, onde o C3H/He apresenta uma carga inferior a dos macrófagos de BALB/c e C57BL/10. Por outro lado, não houve diferença entre eles em relação a taxa de infecção dos macrófagos (Figura 4.22B e 4.22C). E observamos que quando comparado com a infecção de macrófagos não estimulados, macrófagos BALB/c apresentaram a partir 72 de infecção diferença no número de amastigotas por célula, na porcentagem de células infectadas e na carga parasitária total. Nas demais linhagens não houve diferença (Figura 4.23).



**Figura 4.21.** Padronização da concentração aminoguanidina. Dosagem de nitrito em sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C7BL/10 infectados por *L. amazonensis* (2 MOI) e estimulados por LPS (5µg/mL) após seis horas de infecção. (One way ANOVA Bonferroni .post-tests p<0.05)



**Figura 4.22** Contagem de amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais infectados por *L. amazonensis* tratados com aminoguanidina (100µg/mL) **A)** Média de amastigota por célula. **B)** Porcentagem de células infectadas. **C)** Quantidade de amastigotas por 100 células. (\* p<0.05; \*\*\* p<0.001 Two-way ANOVA pós-teste Bonferroni)



**Figura 4.23** Contagem de amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais infectados por *L. amazonensis* tratados ou não com aminoguanidina (100µg/mL) **A)** Média de amastigota por célula. **B)** Porcentagem de células infectadas. **C)** Quantidade de amastigotas por 100 células. (\*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p< 0.0001 Two-way ANOVA pós-teste Bonferroni)

## **5. DISCUSSÃO**

---

## Discussão

---

Com o intuito de avaliarmos as diferenças existentes entre os macrófagos de camundongos de diferentes perfis genéticos frente à infecção por *L. amazonensis* e estudar os mecanismos envolvidos na resistência do C3H/He, realizamos diferentes análises, avaliando a taxa de infecção, produção de óxido nítrico e citocinas em macrófagos peritoneais originários de três linhagens diferentes de camundongos (de Oliveira Cardoso et al, 2010). Baseado em critérios como cinética da lesão, análise histopatológica e quantificação de parasitos no tecido, estudos anteriores mostraram que o camundongo C3H/He é altamente resistente à infecção por *L. amazonensis*, ao passo que os camundongos C57BL/10 e DBA/2 são sensíveis. Apesar de resistentes, os animais C3H/He permitem uma multiplicação inicial do parasito, que gera uma pequena pápula, que não ulcera. Esta, no entanto, regride espontaneamente, porém sem cura esterilizante, uma vez que amastigotas viáveis foram encontradas no linfonodo drenante do animal 4 meses após a infecção (de Oliveira Cardoso et al, 2010).

Assim, neste trabalho, inicialmente observamos a taxa de infecção e carga parasitária em macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c, C57BL/10 e C3H/He. Pudemos observar que no início da infecção (24 e 48h) não há diferença na porcentagem de células infectadas ou carga parasitária entre os macrófagos oriundos de animais de diferentes *background* genéticos. As promastigotas de *Leishmania* utilizam diversos receptores celulares para sua entrada na célula, tais como receptores de complemento, de fibronectina ou de manose-fucose (Kane; Mosser, 2000). Hsiao et al (2011) mostraram que a diferença de expressão do receptor de complemento 3 (CR3) entre uma linhagem de macrófagos imortalizados e uma cultura primária de macrófagos humanos provoca uma diferença na orientação do parasito no momento de sua adesão à célula hospedeira, influenciando assim sua entrada e sobrevivência. Desta forma, uma hipótese válida seria pensar que a diferença de susceptibilidade entre as linhagens se desse por conta de uma mutação ou diferença de expressão destes receptores. Entretanto, nossos resultados mostram que não houve diferença na entrada do parasito na célula, sugerindo que a carga genética do hospedeiro não exerça influência neste momento da infecção.

## Discussão

---

Pudemos ver que, a partir de 72h de infecção, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c possuem maior porcentagem de células infectadas e maior proliferação de amastigotas do que macrófagos de origem C3H/He, mostrando que o genótipo dos macrófagos influencia a sobrevivência e/ou proliferação das amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo. Gomes et al (2003) realizaram estudo onde analisaram a influência da espécie do parasito durante a infecção de macrófagos. Eles avaliaram a diferença de infecção dos macrófagos de camundongos CBA/J quando infectados por *L. amazonensis* (suscetível), e *L. major* (resistente), e nas primeiras 6 horas de infecção não visualizaram diferença entre os dois grupos, porém a partir de 12 horas foi visto que a infecção por *L. amazonensis* tornou-se duas vezes maior do que a por *L. major*. Nossos resultados não mostraram, com 24h de infecção, diferença na porcentagem de células infectadas, nem na média de amastigotas por células, mas a partir de 72h já foi possível detectar que a taxa de infecção foi maior na linhagem BALB/c do que na C3H/He e as 96h após a infecção também vimos diferença em relação a carga parasitária total. Ramos et al (2014) também demonstraram que macrófagos de camundongos BALB/c são suscetíveis a infecção por *L. amazonensis*, com uma taxa de infecção de 94.3% às 24h e 83,5% às 72h após a infecção. Mostraram ainda que essa suscetibilidade é maior do que quando infectados por outras espécies de *Leishmania*, como *L. braziliensis* e *L. shawi*, que as 72h após infecção possuíam aproximadamente 33% e 51% de macrófagos infectados, respectivamente. Estes autores verificaram aumento na quantidade de amastigotas por célula nos macrófagos dos BALB/c ao longo da infecção, mas não obtiveram diferença estatística. Em nosso trabalho também vimos uma tendência a esse aumento em todas as linhagens.

Uma vez estabelecido que existe uma diferença na multiplicação e/ou eliminação das amastigotas entre os macrófagos de BALB/c e C3H/He, fomos estudar os mecanismos envolvidos no combate ao parasito, no qual a ativação do macrófago é o mecanismo crucial. A ativação pela via clássica provoca o aumento da atividade da NADPH-oxidase e conseqüentemente a produção de ROS. O aumento da produção de NO nestes macrófagos deve-se a ativação da enzima iNOS. Ela utiliza a L-arginina como doadora de nitrogênio que espontaneamente se converte em nitrito e nitrato (Van Assche et al, 2011). Promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis* são

---

**Pereira, SS**



## Discussão

---

sensíveis a ação do NO, mostrando uma citotoxicidade dose dependente, sendo as promastigotas mais sensíveis do que as amastigotas (Genestra et al, 2008).

Para avaliarmos se a diferença da proliferação de amastigotas intracelulares nos macrófagos de C3H/He e BALB/c era dependente da produção de NO, realizamos a dosagem de nitrito pela reação de Griess. Alguns trabalhos, como o de Green et al (1990), demonstraram que macrófagos de camundongos C3H/HeN quando infectados com  $10^7$  amastigotas de *L. major* produziram quantidades mínimas de nitrito ( $<9\mu\text{M}$ ) falhando no desenvolvimento de uma resposta citotóxica efetiva, ou seja, produção de NO. Mas essa produção baixa também foi vista em macrófagos não infectados na presença de LPS (100ng) ou IFN- $\gamma$  (100U/mL). Os autores justificam que são necessários dois estímulos em conjunto para disparar a produção de NO. Em nosso trabalho pudemos ver o mesmo ocorrido: a produção de NO pelos macrófagos foi mínima nas três linhagens quando estimulados somente por promastigotas e com isso não pudemos verificar nenhuma diferença de produção entre eles. Mas quando estimulamos os macrófagos com  $5\mu\text{g/mL}$  de LPS pudemos observar altos níveis de produção de nitrito pelas linhagens BALB/c e C57BL/10, os macrófagos da linhagem C3H/He não responderam de maneira eficaz ao estímulo por LPS, independente da dose utilizada. Já foi descrito que os animais C3H/HeJ apresentam uma mutação *missense* no gene *tlr4* que o torna resistente a estimulação por endotoxina (Poltorack et al, 1998). Kmoníčková e Zídek (2004) mostraram que a associação de LPS com IFN- $\gamma$  foi capaz de estimular a produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HeJ. Assim, estimulamos os macrófagos tanto com LPS ( $5\mu\text{g/mL}$ ) quanto com IFN- $\gamma$  (2ng/mL). Com isso, verificamos que todas as linhagens conseguiram produzir nitrito de forma eficaz. Sans-Fons et al (2013) também não observaram diferença na produção de NO entre macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 não estimulados e infectados por *L. major*, sendo esta produção próxima de zero, mas ao estimularem com IFN- $\gamma$  e LPS passaram não só a ver produção como também diferença significativa de produção entre as linhagens. Surpreendentemente, os macrófagos de origem BALB/c, que são suscetíveis a infecção, produziram NO em maior concentração do que os de origem C57BL/6, que são resistentes. Diferente de Sans-Fons et al (2013), em nossos experimentos os macrófagos suscetíveis a infecção por *L. amazonensis*, isto é, de origem BALB/c, de modo geral produziram menos NO do

**Pereira, SS**

---

## Discussão

---

que os C3H/He. As células C3H/He não infectadas também tiveram uma produção maior do que as células de origem BALB/c e C57BL/10 a partir de 72h após a infecção.

Dando sequência, avaliamos também a taxa de infecção e a carga parasitária quando os macrófagos foram estimulados por LPS e IFN- $\gamma$ . Em infecções por promastigotas de *L. infantum* em macrófagos de BALB/c e C57BL/6, Iniesta et al (2001) demonstraram redução drástica entre macrófagos ativados por LPS e IFN- $\gamma$  e não-ativados de ambas as linhagens, sendo bem maior essa redução em macrófagos de origem BALB/c, mostrando que estímulos Th1 favorecem a redução da carga parasitária e da taxa de infecção de macrófagos tanto em linhagens resistentes quanto em linhagens suscetíveis. Para determinarem se amastigotas de *L. amazonensis* eram resistentes a morte por macrófagos, Mukbel et al (2007) estudaram macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C3HeB/FeJ infectados com promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. major*. Eles não observaram diferença significativa na taxa de infecção e a carga parasitária entre os macrófagos infectados pelas duas espécies do parasito. Entretanto, quando as culturas foram ativadas por LPS e IFN- $\gamma$ , 24 horas após a infecção, eles viram que os macrófagos ativados e infectados por *L. major*, no terceiro dia após ativação, possuíam menor taxa de infecção do que os macrófagos ativados infectados por *L. amazonensis* e redução significativa no número de amastigotas quando comparados com macrófagos não ativados. Essa diferença não foi visualizada entre os macrófagos infectados por *L. amazonensis*, mostrando que esta espécie do parasito não é sensível à morte por NO. Nós verificamos que quando macrófagos das três linhagens infectados por *L. amazonensis* foram estimulados por LPS e IFN- $\gamma$  não houve diferença entre eles em relação a taxa de infecção, mas pode-se notar uma importante redução entre cada linhagem quando comparados os protocolos estimulados com o não-estimulados. Ao contrário de Mukbel et al (2007), pudemos visualizar diferença em todas as linhagens na carga parasitária total: quando não estimulados macrófagos das três linhagens já possuíam aproximadamente 100 amastigotas/100 células às 24h após a infecção, enquanto esse valor nos macrófagos ativados por LPS e IFN- $\gamma$  só foi atingido às 96h de infecção, e mesmo assim somente nos macrófagos de BALB/c que possuem significativamente maior carga parasitária que C3H/He. Ou seja, nossos resultados sugerem que a estimulação por LPS e IFN- $\gamma$  reduziu a carga parasitária total em todas as linhagens,

**Pereira, SS**

---

## Discussão

---

apontando para um papel importante da ativação do macrófago no combate ao parasito, independente do *background* genético do hospedeiro.

Ainda trabalhando na hipótese de que a resistência do C3H/He seria dependente de NO, tratamos os macrófagos com aminoguanidina. Este composto nucleofílico é um inibidor seletivo da iNOS, sendo 50 vezes mais eficiente em inibir a atividade enzimática da iNOS do que das formas endotelial e neuronal da NOS (Corbett; McDaniel, 1996). Rodrigues et al (2007) usaram a aminoguanidina para inibir a produção de NO em macrófagos de cachorro infectados por *L. infantum*, obtendo um aumento significativo da porcentagem de células infectadas em relação às células não tratadas. Mukbel et al (2007) trataram macrófagos de camundongos C3HeB/FeJ ativados por IFN- $\gamma$  e LPS infectados por *L. major* ou *L. amazonensis* com L-N-(1-iminoetil) lisina, outro inibidor específico da iNOS, e viram que ao inibirem a iNOS, a capacidade de eliminar o parasito foi anulada pelo tratamento, obtendo um aumento significativo no número de macrófagos infectados em relação aos macrófagos ativados não-tratados. Esses achados demonstram que a iNOS desempenha importante papel na limitação da infecção independente da espécie da *Leishmania* e do hospedeiro. No entanto, de Souza Carmo et al (2010) mostraram que a adição de LPS e TNF à cultura de macrófagos de BALB/c infectados por *L. infantum* provocou um aumento de NO e redução do número de amastigotas, sendo este efeito revertido pela aminoguanidina. No entanto, quando o mesmo experimento foi feito com *L. amazonensis*, a adição de LPS e TNF provocou um aumento de NO, porém sem redução da carga parasitária. Além disso, a adição de aminoguanidina diminuiu o NO sem alterar o número de amastigotas. Com isso os autores, demonstraram que a eliminação das amastigotas *L. infantum* é dependente da ação de NO, enquanto o combate à *L. amazonensis* é independente. Em nosso trabalho, os macrófagos de C3H/He tratados pela aminoguanidina mantiveram uma carga parasitária menor do que as células de BALB/c, mostrando que as diferenças observadas entre as linhagens não puderam ser alteradas por esta droga. Este resultado sugere que quaisquer que sejam os mecanismos que fazem com que os macrófagos C3H/He sejam mais resistentes à infecção do que os BALB/c, a atividade da iNOS não está relacionada. Outros estudos tornam-se necessários para que este resultado possa ser confirmado.

Pereira, SS

---

## Discussão

---

Diversos estudos demonstram que parasitos de *Leishmania*, tanto na forma promastigota quanto na forma amastigota, podem modular a produção das citocinas pelos macrófagos (Cunningham, 2002). A *L. amazonensis* especificamente é conhecida por modular a resposta imune do hospedeiro, inibindo a produção de NO pelos macrófagos e impedindo sua ativação pela via clássica. Dentre os mecanismos identificados para esta sua habilidade estão o aumento da expressão da arginase (Osorio y Fortéa et al, 2009), alteração na expressão de citocinas, ativação de fosfatases entre outros (Gomes et al, 2014). Portanto, avaliamos a produção de citocinas pelos macrófagos das três linhagens para verificarmos se há diferenças no perfil de citocinas produzidas por diferentes perfis genéticos do hospedeiro infectados por *L. amazonensis*.

Em 2011, Souza et al viram que na infecção de camundongos CBA com diferentes isolados de *L. amazonensis*, a produção de IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-10 e IL-4 foi extremamente baixa, com animais desenvolvendo lesões progressivas e com aumento de carga parasitária durante todo o período do experimento (10 semanas). Lemos de Souza et al (2000) já tinham visto que camundongos CBA quando infectados por *L. amazonensis* praticamente não produziam IFN- $\gamma$  e IL-10, mas viram também que quando infectados por *L. major*, produziam IFN- $\gamma$  e IL-10 e conseguiam controlar a infecção. Horta et al (2012) ao avaliar a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos de camundongos C57BL/10 infectados por *L. amazonensis* e por *L. major*, observaram que os infectados por *L. amazonensis* produziam baixos níveis de TNF- $\alpha$  quando comparados a infecção por *L. major*. Assim como ocorreu com infecção de camundongos resistentes (C3H/HeN, C57BL/10) e sensíveis (BALB/c) à infecção por *L. major*, que produziam mais TNF- $\alpha$  do que quando infectados por *L. amazonensis*, após dois dias de infecção. Já Ramos et al (2014) viram em sobrenadantes de cultura que macrófagos de BALB/c infectados por promastigotas de *L. shawi* e *L. braziliensis* apresentavam aumento nos níveis de IL-12 e TNF- $\alpha$  quando comparados a seus respectivos controles, porém não houve diferenças significativas em relação ao controle, na expressão de TNF- $\alpha$  e IL-12 quando infectados por *L. amazonensis*. A análise do soro de pacientes infectados por *L. amazonensis* também demonstrou que a produção de IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10 pelos pacientes não possuía diferença significativa em relação a produção pelos pacientes saudáveis, mas os níveis de TNF- $\alpha$  eram bem maiores em pacientes infectados quando comparados aos

**Pereira, SS**

---

## Discussão

---

saudáveis (Espir et al, 2014). Em nosso trabalho, não vimos muitas mudanças no perfil de citocinas entre os macrófagos infectados e controle. De modo geral, os macrófagos de todas as três linhagens produziram citocinas em níveis baixos, com algumas exceções, independente de estarem infectados ou não por *L. amazonensis*.

Em relação à produção de IFN- $\gamma$  é sabido que o controle da infecção por diferentes parasitos intracelulares em macrófagos é criticamente dependente da ação direta do IFN- $\gamma$  sobre eles (Lykens et al, 2010). O camundongo C3H/HeJ é resistente à infecção por *L. major* (Laskay et al, 1995) e *L. donovani* (Lehmann et al, 2000). A estimulação de linfócitos de baço obtidos de camundongos C3H/HeJ, C57BL/6, BALB/c e B10D2/n por concanavalina A e posterior infecção por *L. donovani* mostrou que o C3H/HeJ é a linhagem com maior potencial de produção de IFN- $\gamma$ . Os macrófagos de origem C3H/He de nossos experimentos, que são considerados resistentes, apresentaram altos níveis de IFN- $\gamma$  e níveis relativamente altos de IL-10 e IL-12 independente da infecção por *L. amazonensis*. Estes resultados nos levam a pensar que esta resistência do C3H/He poderia estar relacionada com a presença destas citocinas já no momento da infecção.

A IL-10 é um inibidor das funções dos macrófagos, incluindo a produção de NO, a citotoxicidade e a produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 (D'Andrea et al 1993), sendo produzida por diversas células, incluindo células dendríticas e macrófagos, durante o curso das leishmanioses (Kaye; Scott, 2011). Na leishmaniose visceral a IL-10 desempenha papel importante em regular a resposta Th1, reduzindo a proliferação de linfócitos e diminuindo a produção de IFN- $\gamma$ , no entanto o papel da IL-10 na leishmaniose tegumentar não é muito claro (Carvalho et al, 2012). Pacientes com LC produzem IL-10 que inibe respostas inflamatórias que são geralmente induzidas pelo IFN- $\gamma$  (da Silva Santos; Brodskyn, 2014). Murphy et al (2001) avaliaram o papel da IL-10 na resistência durante a infecção por *L. donovani* em camundongos BALB/c IL-10<sup>-/-</sup> e C57BL/6 IL-10<sup>-/-</sup>. Ambas as linhagens de camundongos foram altamente resistentes a infecção, podendo ser evidenciado pela carga parasitária no fígado que era dez vezes menor do que a dos camundongos controle após 14 dias de infecção. Essa resistência foi acompanhada pelo aumento da produção de IFN- $\gamma$  e NO pelos camundongos BALB/c IL-10<sup>-/-</sup>. Quando estes foram tratados com anticorpos neutralizantes para IFN- $\gamma$

**Pereira, SS**

---

## Discussão

---

ou IL-12, a suscetibilidade à infecção aumentou, mostrando assim que na infecção por *L. donovani*, a IL-10 inibe a formação de uma resposta imune de resistência. O aumento de IL-10 e IL-4 está relacionado ao aumento da atividade da enzima arginase 1, facilitando o crescimento e reprodução do parasito no interior da célula hospedeira (Biswas et al, 2011). Ou seja, a IL-10 é geralmente relacionada à persistência do parasito, ao passo que IFN- $\gamma$  e IL-12 estão relacionadas ao controle do mesmo. Em nosso trabalho, os macrófagos da linhagem C3H/He produziram níveis mais altos de IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$  e níveis mais baixos de TNF- $\alpha$  do que os macrófagos das linhagens BALB/c e C57BL/10.

A expressão de genes de citocinas e quimiocinas é diferencialmente regulada pelos vários TLRs. Assim, IL-12, IP-10 e IFN- $\beta$  são induzidos exclusivamente por agonistas de TLR4, como o LPS, enquanto IL-8, IL-10 e IL-23 são preferencialmente induzidas por agonistas de TLR2. Assim, TLR2 e TLR4 são fatores importantes no estabelecimento e manutenção do balanço Th1/Th2. Enquanto TLR2 induz uma diferenciação em Th2, TLR4 induz Th1 (Re; Strominger, 2004). Além disso, demonstraram que células dendríticas estimuladas através de TLR2 expressam grandes quantidades de IL-10 do que células estimuladas por agonistas de TLR4, e que essa expressão de IL-10 é capaz de suprimir a expressão de IP-10 e IL-12 por agonistas TLR4 (Re; Strominger, 2004). Paul et al (2012) demonstraram que macrófagos do baço de camundongos C3H/HeJ TLR4 mutantes são altamente permissivos ao crescimento da *L. donovani* e que essas células apresentam uma alta expressão de IL-10 e uma diminuição na expressão de IL-12 e TNF- $\alpha$ , mesmo quando tratados com a glicoproteína GP29 que estimula, através de TLR4, a produção de IL-12 e TNF- $\alpha$ . Assim afirmaram que na leishmaniose visceral a cura está associada com a produção de IFN- $\gamma$  induzida pela IL-12, porém a liberação de IL-10 induzida por agonistas de TLR2 bloqueia a expressão de citocinas Th1 induzidas por TLR4, tais como IL-12, levando à susceptibilidade. Os animais C3H/He utilizados em nossos experimentos não respondem ao LPS devido a uma mutação no gene *tlr4* e, desta forma, a produção de IL-10 não é capaz de bloquear a expressão de citocinas Th1, pois essa produção deve estar sendo mediada por outro mecanismo que não seja afetado pela IL-10. Assim, acreditamos que apesar de produzirem IL-10, em nosso modelo de resistência, esta citocina não tenha um papel tão pronunciado na persistência do

**Pereira, SS**

---

## Discussão

---

parasito. Foi visto que células Th1 de camundongos infectados por *Toxoplasma gondii* produzem IL-10, mas a secreção desta citocina não possui impacto na eliminação do parasito e sim na limitação de patologia (Engwerda et al, 2014). Assim, podemos sugerir que os camundongos BALB/c sejam suscetíveis a infecção por possuírem uma supressão inicial da produção das citocinas pró-inflamatórias, que são essenciais para o controle do parasito, que posteriormente não são mais suprimidas devida a não produção de IL-10, levando assim a formação de danos teciduais graves, principalmente pela ação do TNF- $\alpha$ . Já os camundongos C3H/He não possuiriam danos teciduais devido a produção de altos níveis de IL-10.

Carrera et al (1996) realizaram experimentos com camundongos resistentes (C57BL/6 e C3H/HeN) e sensíveis (BALB/c) à infecção por promastigotas *L. major* e analisaram a expressão e produção das citocinas IL-12, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (2h, 6h e 18h de infecção). Observaram que tanto nas linhagens resistentes quanto na sensível a expressão e produção das citocinas IL-12 e TNF- $\alpha$  não foram detectáveis, no entanto foi possível detectar produção em baixos níveis da citocina IL-1 $\alpha/\beta$  nos macrófagos C3H/HeN. Mas quando estimularam as células com LPS e IFN- $\gamma$  todas as linhagens do estudo passaram a produzir IL-12. Monócitos humanos infectados por promastigotas de *L. major* provenientes de dois isolados com diferentes graus de virulência apresentaram após 24h de infecção, altos níveis de TNF- $\alpha$  e baixos níveis de IL-12p40 e IL-10, além de níveis significativamente mais altos de TGF- $\beta$  em relação ao controle, com carga parasitária crescente em ambos os isolados. Ao estimularem os monócitos com IFN- $\gamma$  (overnight) e posteriormente co-incubar com LPS e parasito por 2h, não viram diferença entre os isolados, porém ambos produziram níveis aumentados de IL-10 e IL-12 quando comparados aos monócitos não-estimulados por IFN- $\gamma$  e LPS. (Meddeb-Garnaoui et al, 2009). Belkaid et al (1998) viram por citometria de fluxo a produção de citocinas em macrófagos inflamatórios de linhagens resistentes (CBA e C57BL/6) e sensível (BALB/c) à infecção por promastigotas de *L. major* estimulados ou não por LPS/IFN- $\gamma$ . Observaram que na ausência de ativação, células não infectadas de todas as linhagens do estudo não apresentaram marcação para IL-12, mas apresentaram pequena marcação para TNF- $\alpha$ . Já em resposta ao estímulo de LPS/IFN- $\gamma$ , todas as células não infectadas mostraram produção exacerbada de TNF e tornaram-se positivas para IL-12, sendo maior a produção nas linhagens resistentes. Quando as células foram ativadas

**Pereira, SS**

---

## Discussão

---

após a infecção, somente 0,1%-2% das células das linhagens passaram a produzir IL-12, tendo assim uma brusca redução na produção, não sendo vista essa redução na produção de TNF. Em nossos experimentos, a ativação por LPS/IFN- $\gamma$  aumentou fortemente a produção de TNF, IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$  pelos macrófagos de BALB/c, mostrando que este camundongo responde muito bem ao estímulo. Embora também tenha aumentado, a produção de IL-10 foi a menos afetada, mantendo níveis bastante inferiores ao dos macrófagos C57BL/10. Sans-Fons et al (2013) já haviam mostrado que camundongos BALB/c respondem melhor do que animais C57BL/6. É possível que a baixa estimulação de IL-10 contribua para esta resposta exacerbada dos macrófagos de BALB/c. Por outro lado, as células de C3H/He responderam ao estímulo por LPS/IFN- $\gamma$  de forma muito mais branda. Eles aumentaram seus níveis de TNF e IL-6, de forma mais leve do que os macrófagos de BALB/c, mantiveram baixos seus níveis de IL-1 $\beta$  e reduziram a quantidade de IL-10 e IL-12. Isso mostra que estas células não responderam bem ao estímulo por LPS/IFN- $\gamma$  no que diz respeito à produção de citocinas, muito embora tenham aumentado sua produção de NO de maneira mais significativa do que os macrófagos de BALB/c e C57BL/10. Assim como Ibraim et al (2013) mostraram que macrófagos de camundongos C57BL/6 TLR4<sup>-/-</sup> selvagens tratados previamente com IFN- $\gamma$  e infectados por *L. braziliensis* ou *L. infantum* não produziam ou produziam em baixos níveis as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  e IL-10 e IL-12, mas possuíam produção de NO elevada. Os autores concluem então que a produção do NO não é dependente do TLR4.

A IL-6 pode ter papel tanto inflamatório quanto anti-inflamatório, sendo sua produção induzida por IL-1 e TNF (Arango Duque; Descoteaux, 2014). Em BALB/c, a inoculação de parasitos expressando GP63 promoveu um aumento de secreção de TNF e IL-6 e aumentou o fluxo de neutrófilos e monócitos inflamatórios para o sítio de inoculação, tipos celulares que favorecem o estabelecimento da infecção (Arango Duque et al, 2014). Em pacientes com leishmaniose mucocutânea, a produção de IL-17 em associação com IL-6 e IL-1 $\beta$  foi correlacionada com destruição tecidual (Boaventura et al, 2010). Análise do soro de pacientes com infecção primária ocasionada por *L. guyanensis*, *L. amazonensis* ou *L. naiffi* apresentaram altos níveis de IL-6 quando comparados com controles não infectados; sendo que não houve diferença na análise entre as diferentes espécies estudadas. (Espir et al, 2014). No nosso caso, mesmo

**Pereira, SS**

---



## Discussão

---

havendo produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  pelos macrófagos de todas as linhagens do estudo não foi possível detectar produção da IL-6 em quaisquer linhagens. No entanto, quando os macrófagos foram estimulados por LPS/IFN- $\gamma$ , ocorreu produção de IL-6, sendo esta maior nas linhagens sensíveis do que na resistente. Na linhagem resistente houve modulação da produção pelo parasito, onde os macrófagos controles produziram mais do que os infectados. Aparentemente a alta produção desta citocina esta correlacionada com a suscetibilidade à infecção. Murray (2008) observaram que camundongos C57BL/6 IL-6<sup>-/-</sup> infectados por amastigotas de *L. donovani* produziram IFN- $\gamma$  desde a primeira semana de infecção, enquanto os selvagens da mesma linhagem somente após duas semanas de infecção. Assim, eles concluíram que camundongos C57BL/6 IL-6<sup>-/-</sup> conseguem solucionar a infecção de forma precoce quando comparados com os camundongos selvagens.

Cargnelutti et al, 2014 viram que camundongos C57BL/6 depletados para o receptor de TNF (TNFR)p55 infectados por *L. amazonensis* apresentaram grandes lesões ulceradas com danos histopatológicos intensos enquanto camundongos selvagens da mesma linhagem ficaram completamente curados em 15 semanas de infecção, demonstrando assim que o TNF possui importante papel no controle da infecção por *L. amazonensis*. Trabalhos anteriores de nosso grupo demonstraram que camundongos BALB/c, C57BL/6 e C57BL/10 infectados por *L. amazonensis* apresentaram lesões progressivas que tornaram-se ulceradas 15 semanas após a infecção com alta produção de TNF- $\alpha$  por camundongos C57BL/6 e BALB/c (Cupolilo et al, 2003). Também foi visto intenso infiltrado inflamatório com grande quantidade de macrófagos vacuolados com amastigotas, e algumas áreas de necrose com amastigotas livres. A carga parasitária não apresentou correlação com a progressão da lesão (Cupolilo et al, 2003). Em nosso trabalho todas as linhagens produziram TNF- $\alpha$ , porém a o produção foi maior e com aumento progressivo na linhagem BALB/c do que a C3H/He quando infectados. Assim, os trabalhos do nosso grupo demonstram que o TNF- $\alpha$  não é benéfico a infecção por *L. amazonensis*, causando graves danos teciduais; ao contrário do que o grupo do Cargnelutti observou. Nós pudemos ver, que tanto estimulado por LPS/IFN- $\gamma$  quanto não estimulado, a produção de TNF- $\alpha$  permaneceu maior nos camundongos BALB/c do que os C3H/He. Em ambas as situações, a linhagem C3H/He apresentou menor carga parasitária do que a BALB/c.

**Pereira, SS**

---

## Discussão

---

Assim, acreditamos que o TNF- $\alpha$  possa estar envolvido nos mecanismos que levam a danos teciduais nas linhagens suscetíveis a infecção, como é visto em pacientes com eritema nodoso hansênico, em que os níveis de TNF- $\alpha$  no soro são altíssimos e correlacionados com as lesões na pele observada nos pacientes. O tratamento desses pacientes com Talidomida (composto com ações anti-inflamatórias), reduziram os níveis de TNF que promoveu melhora das manifestações locais e sistêmicas do eritema nodoso hansênico, assim como reduziu o infiltrado inflamatório de leucócitos polimorfonucleares e células T (Sampaio et al, 1993). Em casos humanos de leishmaniose mucocutânea (LMC) também são relatados altos níveis séricos de TNF- $\alpha$  quando comparado a pacientes humanos com leishmaniose cutânea (LC) e pacientes saudáveis. Sendo visto que o tratamento com antimonial Glucantime® promove redução nos níveis de TNF- $\alpha$  equiparando com os níveis em pacientes saudáveis e pacientes com LC tratados. Isso demonstra a relação entre os elevados índices de TNF- $\alpha$  com o desenvolvimento e os efeitos deletérios da LMC (Da-Cruz et al, 1996).

Sani et al (2014) mostraram que em sobrenadantes de cultura de macrófagos de linhagem J774G8 infectados por *L. major*, a produção de IL-1 $\beta$  é maior do que o controle, após seis horas de infecção. Kautz-Neu et al (2011) realizaram experimentos com camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IL-1 $\alpha/\beta^{-/-}$  infectados por *L. major* e viram que as lesões ocasionadas pela infecção são similares, porém a resolução da infecção pelos camundongos C57BL/6 IL-1 $\alpha/\beta^{-/-}$  ocorre mais tardiamente quando comparados com os selvagens. A produção de IFN- $\gamma$  por ambas as linhagens não mostrou diferença estatística, apesar de ter sido aparentemente maior nos selvagens, e a produção de IL-10 e IL-12 foi similar em ambas grupos de animais, mostrando que a produção de IL-1 $\alpha$  e IL- $\beta$  é dispensável para ao controle da doença. Quando macrófagos destas linhagens foram estimulados por IFN- $\gamma$  ou LPS, ambos apresentaram altos níveis de IL-12. Além disso, os macrófagos dos camundongos C57BL/6 IL-1 $\alpha/\beta^{-/-}$  apresentaram uma fraca produção de IL-10 após 18 horas de infecção, enquanto, as células dos camundongos selvagens não produziram esta citocina (Kautz-Neu et al, 2011). Por outro lado, na infecção de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 por *L. amazonensis*, Lima-Junior et al (2013) observaram que a secreção de IL-1 $\beta$  ocorre de forma dependente do inflamossoma Nlrp3 e caspase 1. Esta secreção é aumentada

## Discussão

---

pele tratamento com LPS, mas depende da presença da *L. amazonensis* viáveis. Além disso, macrófagos depletados para Nlrp3 apresentaram maior carga viral, mostrando a importância da IL-1 $\beta$  no controle ao parasito. Trabalhando com a linhagem A/J, resistente a infecção, estes autores mostraram ainda que camundongos caspase1<sup>-/-</sup> tinham a lesão aumentada, necrose e maior carga parasitária do que o controle selvagem. Assim, todos esses resultados demonstraram que independente do perfil genético do hospedeiro a ativação do inflamosoma Nlrp3 e a IL-1 $\beta$  são importantes para a restrição da multiplicação do parasito. Em nossos experimentos, as células não estimuladas das linhagens sensíveis e resistente produziram quantidades semelhantes de IL-1 $\beta$ , porém quando estimuladas por LPS/IFN- $\gamma$  os macrófagos da linhagem BALB/c produziram altos níveis de IL-1 $\beta$ , enquanto os macrófagos C3H/He não produziram a citocina. Assim, podemos concluir que a produção de IL-1 $\beta$  não é o principal fator que faz com que os macrófagos C3H/He sejam menos suscetíveis do que os BALB/c. É possível porém, que esta citocina participe na restrição do parasito nas células de BALB/c, uma vez que os macrófagos desta linhagem, quando estimulados por LPS/IFN- $\gamma$  apresentaram níveis mais elevados de IL-1 $\beta$  e menor quantidade de amastigotas totais.

Em nosso trabalho vimos que a infecção por *L. amazonensis* apresentou um perfil de resposta singular e diferente entre as linhagens estudadas. Esse perfil ratifica a ideia de não existência de uma polarização de respostas indicativas de suscetibilidade/resistência do hospedeiro (Th1/Th2). Por outro lado, vimos que os macrófagos de C3H/He produziram um nível elevado de algumas citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-10) mesmo antes da infecção, sugerindo que consigam responder mais prontamente à infecção por *Leishmania*. Entretanto, quando estimulados por LPS e IFN- $\gamma$ , esses macrófagos tiveram uma resposta bem mais suave do que os macrófagos de BALB/c, que apresentaram níveis elevadíssimos de IL1 $\beta$ , IL-6, TNF e IL-12. É possível que esta resposta exacerbada do BALB/c esteja relacionada com os grandes danos teciduais observados na infecção destes animais, ao passo que a resposta branda do C3H/He preservaria a integridade do tecido. Quando avaliamos a produção de NO vimos que camundongos C3H/He produziram mais do que os BALB/c, porém mesmo inibindo a produção de NO, não houve uma mudança do perfil de resistência e suscetibilidade entre as linhagens, aparentando, portanto que o NO não é o principal

**Pereira, SS**

---

## **Discussão**

---

mecanismo de resistência no C3H/He. Assim, ainda são necessárias diversas análises para se chegar a um veredicto final, entre elas a avaliação da atividade da arginase expressão de diferentes citocinas e NO e a inibição de algumas citocinas, de modo a estudar o papel de cada uma separadamente.

## **6. CONCLUSÕES**

---

## Conclusões

---

- 1) Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos C3H/He, BALB/c e C57BL/10 são igualmente permissivos a entrada de promastigotas de *L. amazonensis*;
- 2) Macrófagos peritoneais de C3H/He dificultam a multiplicação e/ou são mais eficientes na eliminação de amastigotas de *L. amazonensis*, quando comparados a macrófagos de BALB/c;
- 3) Macrófagos peritoneais não infectados de C3H/He apresentam uma produção inicial de IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$  maior do que macrófagos de BALB/c e C57BL/10;
- 4) Macrófagos peritoneais de C3H/He infectados respondem a estímulo pró-inflamatório com uma maior produção de NO do que células de origem BALB/c;
- 5) O estímulo pró-inflamatório levou a uma diminuição do número total de amastigotas em todas as linhagens estudadas, porém não alterou o perfil de suscetibilidade e resistência entre as linhagens;
- 6) Macrófagos peritoneais de C3H/He respondem de forma mais branda a um estímulo pró-inflamatório do que as células de BALB/c e C57BL/10, no que diz respeito à produção de citocinas;
- 7) A inibição da enzima iNOS não interferiu na resistência dos macrófagos peritoneais de origem C3H/He.

## **7. REFERÊNCIAS**

---

## Referências

---

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular*. 7<sup>a</sup> ed. Elsevier, 2011.
- Afonso LCC, Scott P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun* 1993;61(7):(July):2952-2959.
- Alexander J, Bryson K. T helper (h) 1/ T helper (h) 2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett*. 2005; 99:17-23.
- Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty *Trends Parasitol*, 2006, Oct ;22 (12): 552-7
- Andrade BB, Boaventura V, Barral-Netto M, Barral A. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar: fatos, falácias e perspectivas. *Gaz. Méd. Bahia* 2005; 75: 1 (Jan-Jun): 75-82.
- ArangoDuque G, Descoteaux A. Macrophages cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* 2014; 5:491.
- ArangoDuque G, Fukuda M, Turco SJ, Stäger S, Descoteaux A. *Leishmania* promastigotes induce cytokine secretion in macrophages through the degradation of synaptotagmin XI. *J Immunol* 2014. 193(5):2363-72.
- Assreuy J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'Donnell CA, Moncada S. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur J Immunol* 1994; 24 (3): 672-6.
- Bankoti R, Gupta K, Levchenko A, Stäger S. Marginal zone B cells regulate antigen-specific T cell responses during infection. *J Immunol* 2012. 188:3961-3971.
- Barral A, Badaró R, Barral-Neto M, Grimaldi G Jr, Momen H, Carvalho EM. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1986; 35(4):735-42.
- Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Junior G, Momen H, McMahon Pratt D, et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil, evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44:536-546.

**Pereira, SS**

---



## Referências

---

Basano AS, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectiva de controle. Rev Bras. Epidemiol. 2004; vol 7 (3) 328-337.

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int J Parasitol 2007; 37(10-3): 1097-1106.

Bates PA. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. Curr Opin Microbiol. 2008; 11(4):340-344.

Belkaid Y, Butcher B, Sacks D. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophage at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. Eur J Immunol 1998; 28:1389-1400.

Belkaid Y, Hoffman KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC;Wynn TA, Sacks DL. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. J Exp Med. 2001;194(10):1497-1506.

Belkaid Y, Piccirillo CS, Mendez S, Shevac EM, Sacks DL. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. Nat 2002. 420:502-507.

Ben-Sasson SZ, Hu-Li J, Quiel J, Cauchetaux S, Ratner M, Shapira I et al. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation, Proc Natl Acad U S A 2009; 106(17):7119-24.

Beutler BA. The role of tumor necrosis factor in health and disease. J reumatol Suppl 1999. 57:16-21.

Biswas A, Bhattacharya A, Kar S, Das PK. Expression of IL-10 triggered STAT3-dependent IL-4R $\alpha$  is required for induction of arginase 1 in visceral leishmaniasis. European Journal of Immunology, 2011; 41(4):992-1003.

Blackwell JM, Goswami T, Evans CAW, Sibthorpe D, Papo N, White JK, Searle S, Miller EN, Peacock CS, Mohammed H, Ibrahim M. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. Cell Microbiol 2001;.3 (12):.773-784.

**Pereira, SS**

---

## Referências

---

Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, de Andrade J, dos Santos WL, Clarêncio J, Silva JS, Borges VM, Barral-Netto M, Brodskyn CI, Barral A. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol* 2010. 40 (10):2830-6

Bradley DJ. Regulation of *Leishmania* populations within the host. II. Genetic control of acute susceptibility of mice to *Leishmania donovani* infection. *Clin Exp Immunol* 1977; 30:130-140.

Bradley DJ, Kirkley J. Regulation of *Leishmania* populations within the host. I. The variable course of *Leishmania donovani* infections in mice. *Clin Exp Immunol* 1977; 30:119-129.

Cardoso FO. Estudo imunopatológico da infecção por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* em camundongos suscetíveis e resistentes. Tese de Mestrado – Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2006

Cargnelutti DE, Salomón MC, Celedon V, Cuello-Carrión FD, Gea S, Di Genaro MS, Scodeller EA. Impacto of tumor necrosis factor receptor p55 deficiency in susceptibility of C57BL/6 mice to infection with *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *J Microbiol Immunol Infect* 2014; pii:S1684-1182(14)00066-8.

Carrada G, Cañeda C, Salaiza N, Delgado J, Ruiz A, Sanchez B, Guitierrez-Kobeh L, Aguirre M, Becker I. Monocyte cytokine and coestimulatory molecule expression in patients infected with *Leishmania mexicana*. *Parasite Immunol* 2007; 29(3):117-26

Carrera L, Gazzinelli RT, Badolato R, Hieny S, Müller W, Kühn R, Sacks D. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J Exp Med* 1996; 183:515-526.

Carvalho AK, Silveira FT, Passero LFD, Gomes CMC, Corbett CEP, Laurent MD. *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* promote differential expression of dendritic ccccells and cellular immune response in murine model. *Parasite Immunol.* 2012; 34(8-9):395-403.

**Pereira, SS**

---

## Referências

---

Carvalho LP, Pearce EJ, Scott P. Functional dichotomy of dendritic cells following interaction with *Leishmania braziliensis*: Infected cells produce high levels of TNF- $\alpha$ , while bystander dendritic cells are activated to promoted cell responses. *J immunol.* 2008; 181(9):6473-6480.

Classen A, Lloberas J, Celada A. Macrophage activation: Classical VS Alternative. *Methods Mol Biol* 2009; 531:29-43.doi: 10.1007/978-1-59745-396-7\_3.

Comalada M, Yeramian A, Modolell M, Lloberas J, Celada A. Arginine and macrophage activation. *Methods Mol Biol* 2012; 844:23-35.doi: 1007/978-1-61779-527-5\_16.

Corbett JA, McDaniel ML. The use of aminoguanidine: A selective iNOS inhibitor, to evaluate the role of nitric oxide in the development of autoimmune diabetes. *Methods.* 1996;10:21–30

Costa JML, Saldanha ACR, Silva ACM, Serra-Neto A, Galvão CES, Silva CMP, Silva AR. Estudo atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no estado do Maranhão II Aspectos epidemiológicos, clínico-evolutivos. *Rev. Soc Bra Med Trop* 1992; 25:115-123.

Crocker PR, Blackwell JM, Bradley DJ. Expression of the natural resistance gene *Lsh* in resident liver macrophages. *Infect Immunn* 1984; 43(3):1033-1040.

Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol.* 2002; 72:132-141.

Cupolilo SMN, Souza CSF, Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Gonçalves da Costa SC. Biological behavior of *Leishmania (L.) amazonensis* isolated from human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice. *Histol Histopathol* 2003; 18(4):1059-65.

D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/II-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 1993; 178(3):1041-8.

**Pereira, SS**

---

## Referências

---

Da Silva Santos C, Brodskyn CI. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. *Front Public Health* 2014; 2:165

de Oliveira Cardoso F, Souza CDF, Mendes V G, Abreu-Silva AL, Gonçalves-Costa SC, Calabrese KS. Immunopathological studies of *Leishmania amazonensis* infection in resistant and in susceptible mice. *J Infect Dis*, 2010; 201(12):1933-40

De Souza Carmo EV, Katz S, Barbiéri CL. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. *Plos One* 2010; 5(11): e13815.

Dostálova A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors* 2012; 5:276.

Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2003; 39 (4): 343-50.

Engwerda CR, Ng SS, Bunn PT. The regulation of CD4<sup>+</sup> T cell responses during protozoan infections. *Front Immunol* 2014; 5:498.

Espir TT, Figueira LdeP, Naiff MdeF, da Costa AG, Ramalho-Ortigão M, Malheiro A, Franco AM. The role of inflammatory, anti-inflammatory, and regulatory cytokines in patients infected with the cutaneous leishmaniasis in Amazonas State, Brazil. *J Immunol Res*.2014.2014:481750.

Genestra M, Soares-Bezerra RJ, Gomes-Silva L, Fabrino DL, Bellato-Santos T, Castro-Pinto DB et al. In vitro mediated toxicity towards *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Cell Biochem Funct* 2008; 26:709-717.

Gomes IN, Calabrich AF, Tavares RdaS, Wietzerbin J, de Freitas LA, Veras PS. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes Infect* 2003; 5(4):251-60.

**Pereira, SS**

---

## Referências

---

Gomes RS, de Carvalho LC, de Souza Vasconcellos R, Fietto L; Afonso LC. E-NTPDase (ecto-nucleosidetriphosphatediphosphohydrolase) of *Leishmania amazonensis* inhibits macrophage activation. *Microbes Infect* 2014. S1286-4579(14)00331-1. doi: 10.1016/j.micinf.2014.12.009.

Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36 (1) 71-80

Gonzalez-Lombana C, Gimblet C, Bacellar O, Oliveira WW, Passos S, Carvalho LP, Goldshmidt M, Carvalho EM, Scott P. IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection. *Plos Pathog* 2013; 9(3):e1003243.

Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 2010. 38(5):593-604.

Goto H, Lauletta Lindoso JA. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Infect Dis Clin N Am* 2012; 26:293-307.

Green LC, Green DA, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N]Nitrate in biological fluids. *Analytical Biochem* 1982; 126:131-138.

Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nacy CA. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor alpha. *J Immunol* 1990; 145(12): 4290-7

Griffin GK, Newton G, Tarrio ML, Bu D-X, Maganto-Garcia E, Azcutia V et al. IL-17 and TNF- $\alpha$  sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. *J Immunol* 2012; 188(12):6287-99.

Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 2000, 25, 363-370.

Horta MF, Mendes BP, Roma EH, Noronha FSM, Macêdo JP, Oliveira LS, Duarte MM, Vieira LQ. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. *J Parasitol Res*, 2012;12:11p. doi: 1155/2012/203818.

**Pereira, SS**

---

## Referências

---

Hsiao CH, Ueno N, Shao JQ, Schroeder KR, Moore KC, Donelson JE, Wilson ME. The effects of macrophage source on the mechanism of phagocytosis and intracellular survival of *Leishmania*. *Microbes Infect.* 2011; 13(12-13):1033-44.

Hurdayal R, Brombacher F. The role of Il-4 and Il-13 in cutaneous Leishmaniasis. *Immunol Lett* 2014 <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2013.12.022>

Ibraim IC, de Assis RR, Pessoa NL, Campo MA, Melo MN, Turco SJ, Soares RP. Two biochemical distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasit Vectors* 2013; 6:54.

Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Corraliza I. The inhibition of arginase by N<sup>ω</sup>-hydroxy-L-Arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med* 2001; 193(6):777-783

Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. Interleukin -27 in T cell immunity. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(2):2851-63.

Kane MM, Mosser DM. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin Hematol* 2000; 7:26-31

Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol* 2001. 166(2):1141-7

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

Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9(8):604-15. Doi: 10.1038/nrmicro2608.

Kedzierski L, Evans K. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasitol.* 2014; 30: 1-19.

## Referências

---

Kling JC, Körner H. Different regulatory mechanisms in protozoan parasitic infections. *Int J Parasitol.* 2013. 43:417-425.

Komíncková E, Zidek Z. Quantitative aspects of lipopolysaccharide and cytokine requirements to generate nitric oxide in macrophages from LPS-hyporesponsive (LPS(d)) C3H/HeJ mice. *Folia Microbiol* 2004. 154(23-24):577-83.

Kopf M, Brombacher F, Köhler G, Kienzle G, Widmann KH, Lerang K, Humborg C, Ledermann B, Solbach W. IL-4 deficient BALB/c mice resist infection with *Leishmania major*. *J Exp Med* 1996;184(3):1127-36

Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Prince HE, Herath S, Antoniazzi S, Galanos C, Smith DF, Müller I. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 2004 (a), 72:1920-1928.

Kumar R, Engwerda C. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin Transl Immunology* 2014. 3(3):e13.

Lainson R. Espécies neotropicals de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Rev Pan-Amaz Saude* 2010; 1(2):12-32.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In Peters R, Killick-Kendrick R. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1 Academic Press; London 1987, pp 1-120. Apud Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. Grossage SM, Rogers ME, Bates PA. *Int J. Parasitol.* 2003; 33(10):1027-34.

Lam D, Harris D, Qin Z. Inflammatory mediator profiling reveals immune properties of chemotactic gradients and macrophage mediator production inhibition during Thioglycollate elicited peritoneal inflammation. *Mediators Inflamm* 2013; 2013:931562.

Laskay T, Diefenbach A, Röllinghoff M, Solbach W. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol* 1995; 25(8): 2220-7.

**Pereira, SS**

---

## Referências

---

Leclercq V, Lebastard M, Belkaid Y, Louis J, Milon G. The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. *J Immunol* 1996, 157 (10): 4537-45.

Lehmann J, Enssle KH, Lehmann I, Emmendorfer A, Lohmann-Matthes ML. The capacity to produce IFN-gamma rather than the presence of interleukin-4 determines the resistance and the degree of susceptibility to *Leishmania donovani* infection mice. *J Interferon Cytokine Res* 2000. 20(1):63-77

Lemos de Souza V, Ascensão Souza J, Correia Silva TM, Sampaio Tavares Veras P, Rodrigues de-Freitas LA. Different *Leishmania* species determine distinct profile of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes and Infections* 2000; 2(15):1807- 1815.

Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory Tcell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 2006; 25 (3):455-71

Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva AL, Mineo TW, Gutierrez FR, Bellio M, Bortoluci KR, Flavell RA, Bozza MT, Silva JS, Zamboni DS. Inflammasome-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nat Med* 2013; 19(7):909-15.

Liu D, Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cel Infect Microbiol* 2012; 2:83. Doi: 10.3389/fcimb.2012.00083.eCollection 2012.

Lopes MF, Costa-da-Silva AC, DosReis GA. Innate Immunity to *Leishmania* infection: within phagocytes. *Mediators Inflamm* 2014; 2014:754965.

Loría- Cervera EM, Andrade-Narváez FJ. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 2014, 56 (1): 1-11.

Lykens JE, Terrel CE, Zoller EE, Divanovic S, Trompette A, Karp CL, Aliberti J, Flick MJ, Jordan MB. Mice with a selective impairment of IFN- $\gamma$  signaling in macrophage lineage

**Pereira, SS**

---



## Referências

---

cells demonstrate the critical role of IFN- $\gamma$  activated macrophages for the control of protozoan parasitic infections *in vivo*. J Immunol 2010. 184(2):877-885.

Malafaia G, Rezende SA. O papel dúbio dos neutrófilos na infecção por parasitos do gênero *Leishmania*: Uma breve discussão. SaBios: Rev. Saúde e Biol. 2009, 4(1): 38-44.

McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. Q. J. Med 2014,107:7-14.

Meddeb-Garnaoui A, Zrelli H, Dellagi K. Effects of tropism and virulence of *Leishmania* parasites on cytokine production by infected human monocytes. Clin Exp Immunol 2009; 155: 199-206.

Mendes Wanderley JL, Costa JF, Borges VM, Barcinski M. Subversion of immunity by *Leishmania amazonensis* parasites: possible role of phosphatidylserine as a main regulator. J Parasitol Res. 2012; 2012:981686.

Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role of CD4+ CD25+ regulatory T cell in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. J Experiment Med. 2004. 200:201-210.

Ministério da Saúde. Data SUS. Indicadores e dados básicos–Brasil-2012. IDB 2012. Indicadores de morbidade. Taxa de incidência da leishmaniose tegumentar americana 2012. Disponível em: [http:// www.datasus.gov.br/idb](http://www.datasus.gov.br/idb). Acessado em 15 de abril de 2015.

Ministério da Saúde. Secretária de vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2ª edição, Brasília-DF, Brasil, 2013, 180p

Moraes MAP, Silveira FT. Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 1994;36(5):459-463.

**Pereira, SS**

---

## Referências

---

Mukbel RM, Patten CJr, Gibson K, Ghosh M, Petersen C, Jones DE. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires oxide and superoxide. *AM J Trop Med Hyg.* 2007; 76(4):669-75.

Muraille E, Leo O, Moser M. Th1/Th2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism. *Front Immunol* 2014; 5:603.doi: 10.3389/fimmu.2014.00603.eCollection 2014.

Murphy ML, Wille U, Villegas EN, Hunter CA, Farrell JP. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol* 2001; 31(10): 2848-56.

Murray HW. Accelerated control of visceral *Leishmania donovani* infection in interleukin - 6-deficient mice. *Infect Immun* 2008; 76(9):4088-91.

Neves DP, de Mello, AL, Linard, PM, Vitor RWA. *Parasitologia Humana*, 12<sup>a</sup> Ed, Atheneu, São Paulo. 2011.

Nicolle GL. Culture du parasite du Bouton d'Orient. *C R Acad Sci* 1908; 146:842-843.

Noben-Trauth N, Kropf P, Muller J. Suscetibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. *Science* 1996; 271(5251):987-90.

Novoa R, Bacellar O, Nascimento M, Cardoso TM, Ramasawmy R, Oliveira WN, Schriefer A, Carvalho EM. IL-17 and regulatory cytokines (IL-10 e IL-27) in *L. braziliensis* infection. *Parasite Immunol.* 2011; 33(2):132-6.

Novy FG, McNeal WJ. On the cultivation of *Trypanosoma brucei* . *J Infect Dis* 1904; 1:1-30.

Organização Pan-Americana da Saúde. Informe leishmanioses n° 2- junho de 2014; <http://new.paho.org/leishmaniasis>

Osorio y Fortéa J, de La Llave E, Regnault B, Coppée Y, Milon G, Lang T, Prina E. Transcriptional signatures of BALB/c mouse macrophages housing multiplying *Leishmania amazonensis* amastigotes. *BMC genomics* 2009. 10:119.

Pace D. Leishmaniasis. *J infect* 2014; Suppl 1:S10-8.

**Pereira, SS**

---

## Referências

---

Paul J, Karmakar S, De T. TLR-mediated distinct IFN- $\gamma$  /IL-10 pattern induces protective immunity against murine visceral leishmaniasis. *Eur J Immunol* 2012; 42(8):2087-99.

Peters NC, Sacks DL. The impact of vector mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol.* 2009; 11(9):1290-1296.

Pigott DM, Bhatt S, Golding N, Duda KA et al. Global distribution maps of the leishmaniases. *ELife* 2014, Jun (3),doi: 107554/eLife.02851

Poltorack A, He X, Smirnova I, Liu MA, VanHuffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Casragnoli P, Layton B, Beutler. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282:2085.

Ramos PK, Brito MdeV, Silveira FT, Salgado CG, de Souza W, Picanço-Diniz CW, Picanço-Diniz JA. In vitro cytokines profile and ultrastructural changes of microglia and macrophages following interaction with *Leishmania*. *Parasitol* 2014. 141(8):1052-63.

Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, de Jésus MN, Marzal PC. Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: Estado da Arte. *Quim. Nova* 2003; 26(4): 550 -555

Re F, Strominger JL. IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J Immunol* 2004; 173(12):7548-55

Resende M, Moreira D, Augusto J, Cunha J, Neves B, Cruz MT, Estaquier J, Cordeiro-da-Silva A, Silvestre R. *Leishmania*-infected MHC class II<sup>high</sup> dendritic cells polarize CD4<sup>+</sup> T cells toward a nonprotective T-bet<sup>+</sup>IFN- $\gamma$  + IL-10<sup>+</sup> phenotype. *J Immunol* 2013; 191(1):262-73.

Rodrigues CA, Batista LF, Teixeira MC, Pereira AM, Santos PO, de Sá Oliveira GG, de Freitas LA, Veras PS. Peripheral blood mononuclear cells supernatants from asymptomatic dogs immunized and experimentally challenge with *Leishmania chagasi* can stimulate canine macrophage stored infection. *Vet Parasitol* 2007. 143(3-4):197-205.

**Pereira, SS**

---

## Referências

---

Rogers ME, Bates PA. Leishmania manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *Plos Pathog* 2007; 3(6):e91.

Ronet C, Hauyon-La Torre Y, Revaz-Breton M, Mastelic B, Tacchini-Cottier F, Louis J, Lanois P. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. *J Immunol*. 2010;184(2):886-894.

Rottini MM, Amaral AC, Ferreira JL et al. In vitro evaluation of (-)- $\alpha$ -bisabolol as a promising against *Leishmania amazonensis*. *Exp Parasitol* 2015; 148:66-72.

Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* mice. *Nat Rev Immunol* 2002. 2(11):845-58.

Sampaio EP, Kaplan G, Miranda A, Nery JÁ, Miguel CP, Viana SM, Sarno EN. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *J Infect Dis* 1993;168(2):408-14.

Sani MR, Moghaddam MM, Aghamollaei H, Hassanpour K, Taheri RA, Farnoosh G. Investigation of caspase-1 activity and interleukin-1 $\beta$  production in murine macrophage cell lines infected with *Leishmania major*. *Asian Pac J Trop Med* 2014; 7S1:S70-3. Doi: 10.1016/S1995-7645(14)60205-4

Sans-Fons MG, Yeramian A, Pereira-Lopes S, Santamaria-Babi LF, Modolell M, Lloberas J, Celada A. Arginine transport is impaired in C57BL/6 mouse macrophages as a result of a deletion in the promoter of *Slc7a2* (CAT2), and susceptibility to *Leishmania* infection is reduced. *J Infect Dis* 2013. 207(11):1684-93.

Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J. Disruption of the murine interleukin-4 gene inhibits disease progression during *Leishmania mexicana* infection but does not increase control of *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun* 1995; 63(12): 4894-4899.

Secundino NF, Eger-Mangerich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta PF. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *J Med Entomol* 2005; 42(6):928-38.

**Pereira, SS**

---

## Referências

---

Sharma U, Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. Indian J Exp Biol, 2009; 47: 412-423.

Silva-Almeida M, Carvalho LOP, Abreu-Silva AL, Souza CSF, Haridoim DJ, Calabrese KS. Extracellular matrix alterations in experimental *Leishmania amazonensis* infection in susceptible and resistant mice. Vet Res 2012;43(10).

Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99(3):239-51

Soong L. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. J Immunol 2008;180(7):4355-4360.

Souza VL, Veras PS, Welby-Borges M, Silva TM, Leite RB, Ferraro RB, Meyer-Fernandes JR, Barral A, Costa JM, de Freitas LA. Immune and inflammatory responses to *Leishmania amazonensis* isolated from different clinical forms of human leishmaniasis in CBA mice. Mem Inst Oswaldo Cruz .2011; 106(1):23-31.

Straluzza A, Salvatore C, Pinzone MA, Postorino MC, Cosentino S, Serra A, Cacopardo B, Nunnari G. Mucosal Leishmaniasis: An underestimated presentation of a neglected disease. BioMed Research International, Vol 13, ID805108, 7p.

Tapia FJ, Carceres –Dihomar G, Sanchez MA. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. Immunol Today 15:160-165.

Ueda-Nakamura T, Attias M, de Souza W. Megosome biogenesis in *Leishmania amazonensis*: a morphometric and cytochemical study. Parasitol Res 2001; 87:89-97.

Van Assche T, Deschacht M, Inocência da Luz RA, Maes L, Cos P. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. Free Radic Biol Med 2011; 51(2): 337–351.

Vannier-Santos MA, Martiny A, de Souza W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. Curr Pharmac Des 2002; 8:297-318.

**Pereira, SS**

---

## Referências

---

Vidal S, Tremblay ML, Govoni G, Gauthier S, Sebastiani G, Malo D, Skamene E, Olivier M, Jothy S, Gros P. The *Ity/Lsh/Bcg* Locus: Natural Resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of *Nramp1* Gene. J Exp Med 1995; 182 (3):655-66.

Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. Cell 1993. 73(3):469-85

Wanasen N, Soong L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. Immunol Res 2008. 41: 15-25.doi: 10.1007/s1026-007-8012-y.

World Health Organization. N° 375, update January 2014.;<http://www.who.int/leishmaniasis>.