

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

ROSANA REGINA DE SALDANHA

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM N-METIL GLUCAMINA
SOBRE A FAGOCITOSE, A PRODUÇÃO DE RADICAIS DE
OXIGÊNIO E DE NITROGÊNIO E A PRODUÇÃO DE FNT- α , IFN- γ
E IL-10 POR FAGÓCITOS DE INDIVÍDUOS COM LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA E DE CAMUNDONGOS
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Leishmania
amazonensis***

Brasília - DF

2009

ROSANA REGINA DE SALDANHA

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM N-METIL GLUCAMINA
SOBRE A FAGOCITOSE, A PRODUÇÃO DE RADICAIS DE
OXIGÊNIO E DE NITROGÊNIO E A PRODUÇÃO DE FNT- α , IFN- γ
E IL-10 POR FAGÓCITOS DE INDIVÍDUOS COM LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA E DE CAMUNDONGOS
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Leishmania
amazonensis***

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira

Brasília, DF
2009

ROSANA REGINA DE SALDANHA

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM N-METIL GLUCAMINA SOBRE A FAGOCITOSE, A PRODUÇÃO DE RADICAIS DE OXIGÊNIO E DE NITROGÊNIO E A PRODUÇÃO DE FNT- α , IFN- γ E IL-10 POR FAGÓCITOS DE INDIVÍDUOS COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA E DE CAMUNDONGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Leishmania amazonensis*

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr^a Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Dalmo Correia Filho
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr^a Anamélia Lorenzetti Bocca
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Joel Paulo Russomano Veiga
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães
Universidade de Brasília

Prof. Dr^a Luciana Menezes da Silva Flannery
Universidade de Brasília

Brasília, ____ de _____ de 2009.

Este trabalho foi desenvolvido com apoio financeiro da FAP-DF (Processo PRONEX/FAPDF 193.000-114/2004), FAHUB (processo 002/2007), com recursos de bancada da pós-graduação em Patologia Molecular/PROF/CAPES e recursos de bancada da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Dedicatória

À Deus, luz e força no meu caminho.
Aos meus pais, Jairo e Georgina, pelo amor e exemplo de vida.

Agradecimentos

Antes de tudo a Deus que é presença constante em minha vida. A Jesus e Maria que me acompanham. À minha mãe pelo dom da vida e por todo o amor e carinho que sempre me deu. Ao meu pai (*in memorian*) pelo amor e firmeza de princípios. À minha tia Haydée pela sua alegria e carinho inocentes. Aos meus avós, em especial minha avó Alexandrina (*in memorian*) que sempre se entusiasmou com meus estudos.

À minha orientadora, prof^a Dr^a Maria Imaculada Muniz Barbosa Junqueira, pela oportunidade, orientação, apoio e por partilhar seus conhecimentos.

Ao professor Dr Carlos Eduardo Tosta, por partilhar experiências de vida e científicas.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina da UnB, em especial a Vanessa Viana Cardoso, uma grande companheira.

Aos profissionais técnicos do laboratório, René Pires, Nelson Pelet Nascimento, Marthina Gomes, e em especial à Shirley Claudino Couto, que se tornou uma grande amiga.

À Selma Kuckelhaus pelo apoio nos experimentos com modelos experimentais.

Aos alunos de medicina da turma 83 que auxiliaram no tratamento dos camundongos.

Aos amigos formados durante as disciplinas de pós-Graduação: Scheila, Viviane e Yanna, pela alegre convivência.

Aos profissionais da Faculdade de Medicina que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho: Dona Maria da Conceição Fernandes, Viviane, Tércio Rodrigues, Felício Sala Neto (*in memorian*).

Aos pacientes portadores de leishmaniose atendidos no ambulatório de dermatologia do HuB que aceitaram participar do presente estudo.

Aos enfermeiros deste ambulatório, pelo auxílio na coleta de sangue dos pacientes. Aos médicos e residentes, em especial à Dr^a Raimunda Nonata

Sampaio e Dr^a Jorgeth Carneiro da Motta que permitiram a viabilidade deste trabalho.

Aos estudantes de pós-graduação que também realizaram seus estudos neste ambulatório, em especial à Diana, Viviane e Killarney, companhias constantes das quartas-feiras.

À minha amiga e companheira de estudo e de laboratório Marianna Carminatti Papa pelo apoio nas noites de experimento.

Aos amigos especiais no apoio que me deram durante este estudo: Inaiara, Débora e amigos das Faculdades JK e Faciplac.

Ao “time” que me prestou um grande apoio neste período: Rosarita, Thaís, Aline, Misael, João Eduardo, Fernando Renato, Cláudio e Daniel.

“A base da minha força, meu refúgio está em Deus.”

Salmo 62:7

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Aspectos epidemiológicos e clínicos.....	2
1.2-Aspectos imunológicos.....	3
1.3-Tratamento.....	18
2. OBJETIVOS.....	22
3. MÉTODOS.....	24
3.1 – Delineamento experimental.....	25
A- ESTUDO EM HUMANOS	
3.1a - Grupos de estudo em seres humanos e aspectos éticos.....	26
3.2a- Caracterização dos aspectos clínicos dos indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e dos indivíduos controles normais.....	28
3.3a– Concentração do antimoniato de N-metil glucamina para o tratamento de indivíduos com LTA	32
3.4a – Preparação da suspensão estoque de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para utilização no teste de fagocitose.....	32
3.5a – Preparação das leveduras para uso no teste de fagocitose.....	33
3.6a- Separaração das células mononucleares do sangue periférico por gradiente de densidade descontínuo com Percoll.....	34
3.7a- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a capacidade fagocitária dos monócitos de indivíduos com LTA e controles normais.....	35
3.8a - Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção de peróxido de hidrogênio por monócitos de indivíduos com LTA e dos indivíduos controles normais.....	36

3.9a- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção de FNT- α e IL-10 pelos monócitos de indivíduos com LTA e de indivíduos controles normais.....37

3.10a- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina na produção de IFN- γ pelas células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com LTA e de indivíduos controles normais.....39

B- ESTUDO NO MODELO EXPERIMENTAL

3.1b - Grupos de estudo em camundongos e aspectos éticos.....40

3.2b- Grupos de estudo em camundongos para avaliação da influência do antimoniato de N-metil glucamina sobre a fagocitose, a produção de peróxido de hidrogênio e a produção de óxido nítrico.....40

3.3b – Condições de cultivo e diluição de *Leishmania amazonensis* para as infecções em modelos experimentais..... 42

3.4b – Concentração do antimoniato de N-metil glucamina utilizado no tratamento da infecção dos modelos experimentais.....43

3.5b - Obtenção dos macrófagos peritoneais43

3.6b- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina na capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais.....44

3.7b- Preparação do *pool* de plasma fresco para avaliação da fagocitose facilitada por opsoninas.....44

3.8b- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina na produção de peróxido de hidrogênio em macrófagos peritoneais.....45

3.9b- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina na produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais.....45

3.10b- Análise estatística.....46

4-RESULTADOS.....48

A- ESTUDO EM HUMANOS

4.1a- Influência do tratamento com N-metil glucamina sobre a capacidade fagocitária dos monócitos de indivíduos com LTA e indivíduos controles pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos.....49

4.2a- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a capacidade fagocitária dos monócitos de indivíduos com LTA e indivíduos controles normais pelos receptores para opsoninas.....52

4.3a- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção de peróxido de hidrogênio por monócitos de indivíduos com LTA e indivíduos controles normais.....55

4.4a- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção de FNT- α e IL-10 pelos monócitos de indivíduos com LTA e de indivíduos controles normais.....	58
4.5a- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção de IFN- γ pelos indivíduos com LTA e controles normais.....	63
B- ESTUDO NO MODELO EXPERIMENTAL	
4.1b- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre as funções de macrófagos peritoneais murinos.....	67
4.2b- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a capacidade de fagocitária dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.....	67
4.3b- Influência do tratamento com N-metil glucamina sobre a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 pelos receptores para opsoninas.....	73
4.4b- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção de radicais de oxigênio por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6.....	78
4.5 b- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção de radicais de nitrogênio (Óxido Nítrico) pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6.....	82
5- DISCUSSÃO.....	87
5.1- Estudo em seres humanos.....	88
5.2- Estudo em camundongos.....	98
6- CONCLUSÕES.....	106
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
8-ANEXOS.....	125

Lista de figuras

- Figura 1:** Delineamento experimental.....25
- Figura 2:** Comparação da capacidade fagocitária de monócitos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos entre indivíduos com leishmaniose cutânea e indivíduos controles normais (controle x antes), e avaliação da influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina na capacidade fagocitária de monócitos de indivíduos com leishmaniose antes, no sétimo dia e ao final do tratamento.....51
- Figura 3:** Comparação da capacidade fagocitária de monócitos, pelos receptores para moléculas do sistema do complemento, entre os indivíduos com leishmaniose cutânea e controles normais (controle x antes), e a avaliação da influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a capacidade fagocitária de monócitos de indivíduos com leishmaniose antes, no sétimo dia e ao final do tratamento.....54
- Figura 4:** Comparação da produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos de indivíduos com leishmaniose cutânea e de indivíduos controles normais e avaliação da influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção de peróxido de hidrogênio por monócitos de indivíduos com leishmaniose antes, no sétimo dia e ao final do tratamento.....57
- Figura 5:** Comparação da produção basal de fator de necrose tumoral- α pelos monócitos dos indivíduos com leishmaniose cutânea e controles normais e influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção desta citocina pelos monócitos dos indivíduos com leishmaniose antes, no sétimo dia e ao final do tratamento.....60
- Figura 6:** Comparação da produção de fator de necrose tumoral- α pelos monócitos estimulados por LPS (1 μ g/mL), por 6h de incubação, entre os indivíduos com leishmaniose cutânea e os controles normais e avaliação da influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção desta citocina pelos monócitos dos indivíduos com leishmaniose antes, no sétimo dia e ao final do tratamento.....61
- Figura 7:** Comparação da produção de interleucina-10 pelos monócitos de indivíduos com leishmaniose cutânea e de indivíduos controles normais e avaliação da influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção basal (gráfico inferior) e estimulada por 6h por LPS (1 μ g/mL) (gráfico superior) desta citocina pelos monócitos dos indivíduos com leishmaniose antes, no sétimo dia e ao final do tratamento.....62
- Figura 8:** Comparação dos níveis plasmáticos de interferon- γ em indivíduos com leishmaniose cutânea e indivíduos controles normais e avaliação da influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a concentração plasmática da citocina em indivíduos com leishmaniose tegumentar antes, no sétimo dia e ao final do tratamento.....65
- Figura 9:** Comparação da produção de interferon- γ pelas células mononucleares do sangue periférico (monócitos e linfócitos) de indivíduos com leishmaniose cutânea e de indivíduos controles normais estimulados com fitohemaglutinina (5 μ g/mL) e avaliação da influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a

produção da citocina em indivíduos com leishmaniose antes, no sétimo dia e ao final do tratamento.....66

Figura 10: Comparação entre as capacidades fagocitárias dos macrófagos peritoneais provenientes das linhagens de camundongos Balb/C e C57BL/6 que receberam salina; que foram tratados com antimoniato de N-metil glucamina (Gluc); que foram infectados com *Leishmania* (Leish) e que foram infectados com *Leishmania* e tratados com a droga (Gluc+Leish).....71

Figura 11: Comparação entre as capacidades fagocitárias dos macrófagos peritoneais provenientes das linhagens de camundongos Balb/C e C57BL/6 que receberam salina; que foram tratados com antimoniato de N-metil glucamina (Gluc); que foram infectados com *Leishmania* (Leish) e que foram infectados com *Leishmania* e tratados com a droga (Gluc+Leish).....72

Figura 12: Comparação entre as capacidades fagocitárias dos macrófagos peritoneais provenientes das linhagens de camundongos Balb/C e C57BL/6 que receberam salina; que foram tratados com N-metil glucamina (Gluc); que foram infectados com *Leishmania* (Leish) e que foram infectados com *Leishmania* e tratados com a droga (Gluc+Leish).....76

Figura 13: Comparação entre as capacidades fagocitárias dos macrófagos peritoneais provenientes das linhagens de camundongos Balb/C e C57BL/6 que receberam salina; que foram tratados com antimoniato de N-metil glucamina (Gluc); que foram infectados com *Leishmania* (Leish) e que foram infectados com *Leishmania* e tratados com a droga (Gluc+Leish).....77

Figura 14: Comparação entre as produções basais de peróxido de hidrogênio dos macrófagos peritoneais provenientes das linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 dos grupos que receberam salina; que foram tratados com o antimoniato de N-metil glucamina (Gluc); que foram infectados com *Leishmania* (Leish) e que foram infectados com *Leishmania* e tratados com a droga (Leish+Gluc).....80

Figura 15: Comparação entre as produções de peróxido de hidrogênio estimuladas por PMA (20nM) pelos macrófagos peritoneais provenientes das linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 pelos grupos que receberam salina; que foram tratados com o antimoniato de N-metil glucamina (Gluc); que foram infectados com *Leishmania* (Leish) e que foram infectados com *Leishmania* e tratados com a droga (Leish+Gluc).....81

Figura 16: Comparação entre as produções basais de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais provenientes das linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 entre os grupos que receberam salina; que foram tratados com antimoniato de N-metil glucamina (Gluc); que foram infectados com *Leishmania* (Leish) e que foram infectados com *Leishmania* e tratados com a droga (Leish+Gluc).....85

Figura 17: Comparação entre as produções de óxido nítrico estimuladas por LPS (10µg/mL) pelos macrófagos peritoneais provenientes das linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 entre os grupos que receberam salina; que foram tratados com antimoniato de N-metil glucamina (Gluc); que foram infectados com *Leishmania* (Leish) e que foram infectados com *Leishmania* e tratados com a droga (Leish+Gluc).....86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação, idade, sexo, localização e tempo de surgimento das lesões e exames diagnósticos dos indivíduos com leishmaniose cutânea estudados.....30

Tabela 2: Identificação, idade e sexo dos indivíduos controles que participaram do estudo.....31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMN – Células mononucleares
CO₂ - Dióxido de carbono
DO - Densidade óptica
FNT- α – Fator de necrose tumoral- α
gp63 – Glicoproteína de superfície 63
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
IFN- γ - Interferon- γ
IgG- Imunoglobulina G
IL-2- Interleucina 2
IL-4- Interleucina 4
IL-10- Interleucina 10
IL-12- Interleucina 12
JAK/STAT- Via de sinalização para receptores de citocinas
LPG- Lipofosfoglicano
LPS- Lipopolissacarídeo
MAP-cinase-Proteína cinase ativada por mitógenos
NADPH- Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaHCO₃- Bicarbonato de sódio
NO- Óxido nítrico
PKC- Proteína cinase C
PMP- Padrões moleculares de patógenos
Sb^V- Antimônio pentavalente
SFB- Soro Fetal Bovino
STF- Solução salina tamponada com fosfato
Ta1- Linfócito auxiliar do tipo 1
Ta2- Linfócito auxiliar do tipo 2
TGF- β - Fator transformador de crescimento- β

Resumo

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e estima-se que 12 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas. Os fagócitos são importantes para a defesa contra o parasito, por serem as células hospedeiras e responsáveis pela sua eliminação. A droga de escolha para o tratamento das leishmanioses no Brasil é o antimoniato de N-metil glucamina, e apesar da sua ampla utilização, ainda não possui seu mecanismo de ação elucidado. O presente estudo avaliou a influência do tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina sobre a capacidade fagocitária, a produção de peróxido de hidrogênio, de FNT- α , IL-10 e de IFN- γ por monócitos de 17 indivíduos portadores de leishmaniose cutânea durante o tratamento com esta droga; e também a sua influência sobre a capacidade fagocitária, a produção de peróxido de hidrogênio e a produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados pela *Leishmania amazonensis*. No estudo em humanos, o índice fagocitário dos indivíduos infectados se mostrou menor do que o dos indivíduos controles. Já no sétimo dia de tratamento dos indivíduos, observou-se aumento na capacidade fagocitária. Os indivíduos infectados apresentaram produção de peróxido de hidrogênio maior do que a dos controles, e o tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina não modificou este perfil de produção. A produção de FNT- α dos indivíduos infectados foi menor que a dos controles, e o tratamento aumentou significativamente esta produção. A produção de IL-10 de indivíduos infectados foi muito baixa, detectada em poucos indivíduos, e na vigência do tratamento não foram observadas diferenças entre os grupos. A produção do IFN- γ de indivíduos infectados apresentou um pequeno aumento em relação aos controles, mas não se sabe se isto possui significado biológico. O tratamento não influenciou na produção desta citocina. Nos estudos com camundongos, a capacidade fagocitária dos camundongos C57BL/6 controles se mostrou maior do que a dos animais BALB/c. Após a infecção, houve aumento da capacidade fagocitária dos camundongos BALB/c tanto pela infecção como pelo tratamento, enquanto não houve resposta para os animais C57BL/6. A produção do peróxido de hidrogênio pelos animais controles foi maior para os camundongos C57BL/6. Entretanto, a produção de peróxido de hidrogênio foi maior para os camundongos BALB/c após o tratamento, enquanto não houve resposta dos animais C57BL/6. Embora a produção de óxido nítrico nas duas linhagens tenha se mostrado baixa, foi maior para os camundongos BALB/c. É possível que esta produção exacerbada de radicais livres pelos animais BALB/c contribua para a patogenia da infecção. O antimonial foi capaz de modificar as funções de fagócitos de seres humanos e de camundongos BALB/c infectados, influenciando a resposta do hospedeiro contra o parasito. A compreensão do modo de ação desta droga não esclarece apenas os mecanismos da relação-parasito hospedeiro, como também contribui para uma terapia mais adequada para as leishmanioses.

Abstract

Leishmaniasis is caused by protozoans of *Leishmania* genus and there are an estimated 12 million people infected worldwide. Phagocytes are important in defense against parasite because they are host cells and may eliminate parasite. The meglumine antimonate is the drug of choice to treat leishmaniasis in Brazil, and in spite of being widely used its mechanism of action remains unknown. This study evaluated the influence of meglumine antimonate treatment on phagocytic capacity, hydrogen peroxide production, and TNF- α , IL-10 and IFN- γ production by monocytes and/or lymphocytes from 17 cutaneous leishmaniasis individuals during the treatment; and in addition, evaluated the influence of the drug on phagocytic capacity, hydrogen peroxide and nitric oxide production by peritoneal macrophages from BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania amazonensis*. In the study with humans, the phagocytic capacity of leishmaniasis individuals was lower than that of control. The meglumine antimonate administration to leishmaniasis subjects caused a significant increase in phagocytosis already observed on the seventieth day of treatment. The leishmaniasis subjects showed higher hydrogen peroxide production than control and treatment with meglumine antimonate did not influence the production of this oxygen radical. Leishmaniasis individuals showed significant decrease of TNF- α production and treatment caused a significant increase of this cytokine production. The leishmaniasis subjects showed a very low production of IL-10, and this cytokine was detected in only a few individuals, and during the treatment there was no differences between the studied groups. The IFN- γ production by *Leishmania* infected individuals showed a little increase compared with the controls, but the biological meaning of this phenomenon is unknown. In the study with mice, the phagocytic capacity of C57BL/6 healthy mice was higher than that from BALB/c animals. However, the *Leishmania amazonensis* infected-BALB/c animals showed higher phagocytic capacity than control animals and there was an increase on phagocytic capacity after meglumine antimonate treatment, while there was no influence of the drug or infection for C57BL6 mice. The hydrogen peroxide production was higher in control animals for C57BL6 mice. However, the hydrogen production was higher in BALB/c mice after treatment, but there was no response in C57BL/6 animals. In the same way, although nitric oxide production was low in both inbred animals, this production was higher to the BALB/c animals. It is possible that this enhanced radical oxygen species production by the BALB/c animals may contribute to the severity of lesions observed. Our data showed that the meglumine antimonate could interfere in the phagocyte functions of humans and infected-BALB/c mice, showing that this drug may influence in the host-parasite response. These findings shed some light on the understanding of host-parasite relationship and it may improve the treatment of *Leishmania* infected-individuals.

1-Introdução

1.1- Aspectos epidemiológicos e clínicos

As leishmanioses são importante problema de saúde pública, acometendo 12 milhões de pessoas no mundo, sendo que 2 milhões de indivíduos são infectados anualmente, ocorrendo 70.000 mortes a cada ano e há 350 milhões de pessoas em risco de contrair a infecção e doença no mundo (WHO, 2009).

A leishmaniose cutânea é uma doença endêmica em 70 países e 90% dos casos ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria. Na década passada o número de casos aumentou como documentado no Afeganistão, Bolívia, Brasil, Colômbia, Peru e Síria (Reithinger e cols, 2007). A doença é influenciada por aspectos socioeconômicos, políticos e ambientais, que contribuem para o aumento do número de casos, agravado pelo fato de ser uma doença negligenciada como problema de saúde pública em países em desenvolvimento (Hotez e cols, 2008). Estes países possuem problemas de urbanização e sofrem com as mudanças climáticas resultantes do aquecimento global (Bailey e cols, 2007; Ready, 2008).

A doença possui várias formas de apresentação clínica: tegumentar (cutânea, cutâneo-mucosa e difusa) e visceral. Na forma cutâneo-mucosa podem ocorrer mutilações graves e mesmo o óbito, o qual também pode ocorrer na forma visceral da doença. Observa-se associação entre as formas de leishmaniose tegumentar com as espécies do parasito, como pode ocorrer na relação da *Leishmania braziliensis* com a forma cutâneo-mucosa da doença e da *Leishmania major* com a forma cutânea localizada. Da mesma forma, é possível associar as formas da doença com a resposta imune e a genética do

indivíduo infectado, como pode ocorrer na forma cutâneo-difusa que acomete indivíduos imunodeprimidos (Bogdan e cols, 1996; Reithinger e cols, 2007).

O impacto da doença sobre o indivíduo deve ser ainda considerado, visto que como consequência suas lesões podem desfigurar, incapacitar e ocasionar estigma social e psicológico (Bern e cols, 2008; WHO, 2009).

O protozoário do gênero *Leishmania* é um parasito hemoflagelado, pertencente à ordem *Kinetoplastida* (Schuster e Sullivan, 2002). Ele pode ser encontrado em animais que atuam como reservatórios, como cães e roedores (ciclo zoonótico da doença) ou em humanos (ciclo antroponótico da doença) (Piscopo e Azzopardi, 2006). Os mosquitos que atuam como vetores são os do gênero *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus* em outros continentes.

Durante o repasto em animais ou indivíduos infectados, o mosquito ingere o parasito na sua forma amastigota (aflagelado, intracelular), e dentro do seu intestino, a leishmânia assume a forma promastigota (móvel), migrando para a probóscida do inseto. Durante um novo repasto, os mosquitos infectados regurgitam as formas promastigotas no tecido subcutâneo do tegumento do hospedeiro, aonde os parasitos irão invadir ou ser fagocitados por células do hospedeiro, principalmente por macrófagos. Dentro do fagolisossoma dos macrófagos, as formas promastigotas se tornam amastigotas, e se replicam, infectando outros macrófagos, nas proximidades ou em tecidos distantes. Em um novo repasto do mosquito, completa-se o ciclo da infecção (Reithinger e cols, 2007).

1.2- Aspectos imunológicos

O resultado da infecção por leishmânia, que depende da resposta imune do hospedeiro, está relacionado à forma clínica, e pode resultar em cura clínica ou em progressão da doença (Liese e cols, 2008). A resposta imune celular é a determinante neste processo, e seu mecanismo encontra-se bem definido no modelo experimental. Neste as células (macrófagos, células dendríticas, células *natural killer* (NK), linfócitos T CD4 e CD8), citocinas (principalmente IFN- γ e IL-12) e moléculas efetoras (principalmente óxido nítrico) estão envolvidas no processo de eliminação do patógeno (Bogdan e cols, 1993; Solbach e Laskay 2000).

No modelo experimental, a polarização da resposta celular em auxiliar do tipo 1 (Ta₁) ou tipo 2 (Ta₂) é uma característica marcante, e foi avaliada em estudos de infecção experimental com *Leishmania major*, sendo que o primeiro tipo de resposta conduziria à eliminação do patógeno utilizando o camundongo C57BL/6 e o segundo levaria à lesões que não se curam, à disseminação do parasito e ao desenvolvimento da forma visceral e fatal da doença utilizando o camundongo BALB/c. O perfil Ta₁ é marcado principalmente pela produção de IFN- γ (interferon gama) e o Ta₂ pela produção de IL-4 (Sacks e Noben-Trauth, 2002). Estas manifestações são causadas pelo perfil genético do animal, que irá determinar as citocinas a serem produzidas para direcionar a diferenciação dos linfócitos T auxiliares (Gumy e cols, 2004).

Os estudos sobre a genética da susceptibilidade dos camundongos à infecção por leishmânia vêm destacando os genes envolvidos no processo, como o gene *Slc11a1*. Este gene é relatado como sendo importante para a resistência à infecção por *Leishmania donovani* e o mapeamento dos loci importantes para a infecção por *Leishmania major* (Foote e Handman, 2005;

Fortier e cols, 2005). Ainda se devem destacar os estudos em camundongos associando o favorecimento das respostas Ta₁ ou Ta₂ com a deficiência dos genes da IL-4 ou do IFN- γ , e com as citocinas características de cada perfil de resposta (Rogers e cols. 2002).

Esta dicotomia entre respostas Ta₁ e Ta₂ que conduzem a cura ou a manutenção da doença nos estudos utilizando *Leishmania major* é referida por diversos autores como o paradigma da resposta imune contra a leishmânia, que deve ser aplicado com cautela, pois devem ser também consideradas as infecções por outras espécies de leishmânia, que divergiram filogeneticamente a milhões de anos (McMahon-Pratt e Alexander, 2004). Este modelo experimental ainda gera um paradoxo, no qual o papel da IL-4 é questionado por, em determinadas circunstâncias, estimular a produção de IL-12, favorecendo assim a resposta do tipo Ta₁ (Alexander e Bryson, 2005; Tripathi e cols, 2007a).

Analisando os processos imunológicos durante a infecção experimental pela *Leishmania major*, as células dendríticas se destacam como um importante pré-requisito para o estabelecimento da resposta Ta₁, pois podem direcionar a diferenciação destas células por citocinas, como a IL-12, que são secretadas quando ocorre a interiorização das leishmânias pelos receptores Fc γ RI e Fc γ RIII. Por este motivo, estas células têm sido investigadas para o desenvolvimento de vacinas para a leishmaniose cutânea (von Stebut, 2007a).

Entre as citocinas, a IL-10 tem um papel significativo em regular o desenvolvimento de uma resposta protetora do tipo Ta₁, e poderia influenciar na evolução da doença, como também aumentar a susceptibilidade à doença

no modelo de infecção do camundongo C57BL/6 pela *L. major* (Trinchieri, 2007).

A leishmaniose cutânea em humanos não apresenta uma resposta imunológica com uma dicotomia tão clara quanto a descrita no paradigma do modelo experimental que se torna, neste caso, uma simplificação incapaz de explicar uma rede de interações regulatórias intrincadas que podem conduzir ou não à cura do indivíduo (Mansueto e cols, 2007). Nesta doença, a resposta dos linfócitos T do sangue periférico de pacientes exibe características misturadas dos perfis Ta1 e Ta2 (Ajdary e cols, 2000; Bottrel e cols, 2001). Ocorre ainda o predomínio dos linfócitos envolvidos com a resposta do tipo Ta₁, embora no início da infecção possam ser detectadas citocinas do perfil Ta₂ como as interleucinas 4 e 13, que teriam um papel na imunorregulação da doença (von Stebut e Udey, 2004). A leishmaniose cutânea apresenta ainda como característica marcante a produção de IFN- γ e de FNT- α (fator de necrose tumoral alfa), que estão relacionados à cura da doença (Follador e cols, 2002). Deve ser observado que, na infecção pela *L. braziliensis*, o IFN- γ continua a ser produzido no período em que o paciente evolui para a forma cutâneo-mucosa, e as razões para isto ainda não estão totalmente esclarecidas. Isto pode ser devido a anormalidades no local da lesão ou a mudanças no perfil de citocinas de acordo com o tempo de surgimento da lesão (Ribeiro-de-Jesus, 1998).

Ainda na resposta imune celular, tem sido sugerido que o linfócito T CD8 poderia contribuir pela produção de IFN- γ , e ainda promoveria citotoxicidade destruindo os macrófagos infectados, mas estes mecanismos ainda não se encontram totalmente esclarecidos (Ruiz e Becker, 2007).

A leishmaniose mucosa é marcada por destruições teciduais, causadas por uma resposta inflamatória intensa, cujos mecanismos ainda não se encontram totalmente elucidados (Amato e cols, 2003). A leishmaniose cutânea difusa apresenta ausência de resposta imune celular, que está associada à multiplicação do parasito e à severidade da doença, e está relacionada, na fase aguda, à ausência da expressão do mRNA do IFN- γ , enquanto ocorre a expressão dos mRNAs das IL-10, IL-4 e IL-2 (Bomfim e cols, 1996).

Os resultados no modelo experimental C57BL/6 para a leishmaniose cutânea, em que a infecção ocorreu mimetizando a picada do mosquito, em relação à quantidade de microrganismos e a forma de inoculação, revelaram a existência de uma resposta anti-leishmânia que pode ser dividida em fases, de acordo com as células ativadas e envolvidas: na primeira fase, ocorre a invasão de forma “silenciosa” dos macrófagos presentes no tecido subcutâneo devido aos receptores de membrana que permitem a entrada da leishmânia na célula, com o acúmulo de parasitos nos macrófagos e sem a ocorrência de lesão; na segunda fase, acontece a migração e ativação das células do sistema imune inato, como os mastócitos residentes, os neutrófilos e os monócitos, e as lesões se tornam proeminentes; e na terceira fase ocorre a imigração das células dendríticas e linfócitos T e coincide com a involução da lesão; na fase crônica, os parasitos remanescentes contribuem para a manutenção da imunidade pelo resto da vida do indivíduo. É ainda digno de nota que o papel dos linfócitos B no processo está limitado a produzir imunoglobulinas que estão envolvidas na opsonização, onde irão participar fagócitos, como as células dendríticas (von Stebut , 2007b).

Das células da imunidade inata referidas acima, os mastócitos estão envolvidos com o recrutamento de neutrófilos, macrófagos e células dendríticas para o local da infecção e estas últimas, por sua vez, irão migrar para os órgãos linfóides a fim de ativar os linfócitos T e gerarem a resposta protetora ao parasito (Maurer e cols, 2006; Silveira e cols, 2008). Os neutrófilos, por sua vez, possuem um papel controverso dentro da imunidade inata, pois ao mesmo tempo em que são ativos na fagocitose das leishmânias, entram em apoptose e, ao serem fagocitados, permitem a entrada silenciosa dos parasitos nos macrófagos, seus hospedeiros finais. Outra possibilidade sugerida é que ao fagocitar neutrófilos que sofreram apoptose, seria gerado nos macrófagos um ambiente anti-inflamatório, e quando estes fagocitassem parasitos liberados pela morte dos neutrófilos, seriam incapazes de destruí-los (Afonso e cols, 2008; John e Hunter, 2008).

Os macrófagos são as células principais da resposta imune inata; interiorizam e destroem patógenos invasores, instruem a resposta adaptativa pela apresentação de antígenos, eliminam restos celulares derivados de células mortas, eliminam células apoptóticas durante o desenvolvimento e podem mediar a reabsorção óssea, como os osteoclastos (Ravetch e Aderem, 2007). Estas células possuem um papel intrigante na leishmaniose, pois servem ao mesmo tempo como células hospedeiras para os parasitos e como células regulatórias da resposta imune e efectoras equipadas para destruir estes microrganismos.

Os efeitos da infecção por *Leishmania* nos fagócitos têm sido investigados a nível molecular, utilizando métodos de investigação da modificação da expressão gênica cada vez mais sofisticados, como

microarrays de DNA e RNA (Rodriguez e cols, 2004; Ettinger e Wilson, 2008; Gregory e cols, 2008), e análises de transcriptomas (Guerfali e cols, 2008). Além das análises genéticas investigarem os aspectos envolvidos com a infecção, também estudam os aspectos epidemiológicos, mostrando a importância dos genótipos dos parasitos envolvidos e de fatores envolvendo a susceptibilidade à infecção, principalmente quanto à leishmaniose visceral (Jamieson e cols, 2007; Blackwell e cols, 2009).

Os macrófagos se ligam aos microrganismos via receptores específicos e inespecíficos e estes são fagocitados, indo se localizar no interior dos fagossomas (Basu e Ray, 2005). Os macrófagos podem fagocitar formas promastigotas e formas amastigotas de leishmânia, sendo que a resposta imune gerada em consequência deste processo será diferente para cada uma destas formas, principalmente quanto aos mecanismos de destruição do parasito (Kima, 2007). Logo após a picada do inseto vetor, as formas promastigotas é que são fagocitadas, e quando os macrófagos infectados se rompem, ocorre a fagocitose das formas amastigotas pelos macrófagos vizinhos (Descoteaux e Turco, 1999).

A interação inicial com as formas promastigotas ocorre por meio de vários tipos de receptores, como receptores para padrões moleculares de patógenos, receptores para as frações do sistema complemento CR₁ e CR₃, (Alexander e cols, 1999) e receptores para fração Fc da IgG (Peters e cols, 1995; Kima e cols, 2000). Quando o parasito é opsonizado pelos componentes C_{3b} e C_{3bi}, ocorre facilitação da sua entrada na célula hospedeira (Mosser e Rosenthal, 1993; Cunningham, 2002). A interação com CR₁ é transitória, já que ocorre com o componente C_{3b}, enquanto que a de CR₃ ocorre com C_{3bi}, e, além

disto, a interação utilizando CR₃ constitui um mecanismo de escape para o parasito, pois não é capaz de ativar a explosão oxidativa e a produção de IL-12 durante a fagocitose (Descoteaux e Turco, 1999; Olivier e cols, 2005). Os receptores para a porção Fc das IgGs, FcγRs, também estão envolvidos no processo de opsonização dos parasitos, e apresentam ainda a peculiaridade de estimularem a produção de IL-10, o que poderia prejudicar uma resposta imune para a cura (Basu e Ray, 2005, Buxbaum, 2008). Dentre os receptores para padrões moleculares de patógenos, pode ocorrer opsonização com a participação da proteína C reativa na fagocitose de *Leishmania donovani* (Bodman-Smith, 2002); a interação pode ocorrer pelos receptores para manose, que estão envolvidos na fagocitose de promastigotas, (Akilov e cols, 2007), pelos receptores para fibronectina (Brittingham e cols, 1999), receptores de limpeza (Peiser e cols, 2002; Gomes e cols, 2009) e receptores do tipo Toll, como os TLRs 2, 3, 4 e 9 que interagem com o lipofosfoglicano (LPG) (Tuon e cols, 2008).

Na fagocitose das formas amastigotas, estão envolvidos principalmente os receptores para a fração Fc das imunoglobulinas e os receptores para as frações do sistema complemento, como CR₃ (Kima, 2007).

As principais moléculas de superfície das formas promastigotas que constituem ligantes para os receptores das frações do sistema complemento e, com isto, responsáveis pela aderência e entrada da leishmânia no macrófago são o LPG e a gp63 (Lodge e Descoteaux, 2005; Santos e cols, 2006). As formas amastigotas apresentam uma menor quantidade de LPG na sua superfície, em pelo menos três ordens de magnitude (Descoteaux e Turco, 1999).

No interior dos macrófagos, a persistência dos parasitos se deve aos mecanismos de escape, que compreendem: 1) aspectos relacionados ao parasito, como a síntese de enzimas anti-oxidantes e moléculas quelantes de radicais de oxigênio e nitrogênio, a degradação rápida de proteínas que foram danificadas pela célula hospedeira e adaptações metabólicas que permitem ao microrganismo sobreviver à restrição de nutrientes ou a moléculas tóxicas do hospedeiro; e 2) aspectos ligados à supressão de mecanismos efetores da célula hospedeira, como a inibição da expressão de enzimas ligadas à produção de radicais de oxigênio e nitrogênio, o bloqueio do recrutamento destas enzimas para o fagossoma, a inibição da fusão deste último com os lisossomas e o escape do parasito para o citosol; o desvio da resposta imune provocado pelo patógeno, com inibição da apresentação de antígeno, diminuição na produção de moléculas co-estimulatórias de superfície da célula hospedeira, a indução da produção de IL-10 e indução da população de células T regulatórias (Bogdan, 2008; Naderer e McConville, 2008).

A infectividade do promastigota que foi inoculado após a picada do inseto pode ser aumentada por substâncias imunomoduladoras presentes na saliva dos mosquitos do gênero *Lutzomyia*, como o maxadilán, que aumenta a produção de citocinas como IL-6 e IL-10, e da prostaglandina PGE₂ e inibe a produção de FNT- α , IL-12 e de óxido nítrico, diminuindo assim a eficiência da resposta contra o parasito (Titus e cols, 2006).

As células fagocíticas são determinantes para a resposta leishmanicida, devido ao fato de que são capazes de gerar moléculas altamente tóxicas durante o processo de explosão oxidativa – os intermediários reativos de oxigênio e de nitrogênio (Gregory e Olivier, 2005).

A produção dos intermediários reativos de oxigênio é iniciada pela enzima NADPH oxidase, que tem a sua atividade estimulada por produtos microbianos (como o LPS), IFN- γ , IL-8 e pela ingestão da partícula pelo receptor para a porção Fc das imunoglobulinas, durante o processo de fagocitose. Esta enzima catalisa a produção do ânion superóxido, utilizando NADPH como substrato. O ânion superóxido rapidamente é convertido em peróxido de hidrogênio pela enzima superóxido dismutase (SOD) e em radicais hidroxilas e ânions hidroxilas, por reações catalisadas pelo ferro. Pode ainda ocorrer, após a dismutação para peróxido de hidrogênio, a conversão em ácido hipocloroso e cloraminas pela mieloperoxidase (Klebanoff, 1992; Bogdan e cols, 2000). Dentre os intermediários reativos de oxigênio produzidos durante a explosão oxidativa, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) irá atuar causando danos oxidativos ao parasito por gerar o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH^\cdot). Estas espécies reativas atuam sobre o suprimento celular de ferro, sobre os fosfolipídios de membrana, merecendo atenção os danos à membrana mitocondrial interna e sobre o DNA, podendo levar a célula alvo à apoptose (Farber, 1994; Gantt e cols, 2001). De fato, foi observado que o peróxido de hidrogênio induz um mecanismo de morte semelhante à apoptose em formas promastigotas de *Leishmania donovani* (Das e cols, 2001). Na infecção de camundongos BALB/c com *Leishmania guyanensis*, o fenótipo de resistência para a leishmaniose cutânea foi relacionado à explosão oxidativa dos macrófagos que destruiu os parasitos por apoptose (Sousa-Franco e cols, 2006).

O intermediário reativo de nitrogênio produzido pelos macrófagos durante a fagocitose de patógenos é o óxido nítrico (NO), um mensageiro

molecular que é resultante da ação da sintase do óxido nítrico sobre a arginina, o oxigênio e NADPH. Existem duas formas da sintase do óxido nítrico: a constitutiva e a induzida. As formas constitutivas são enzimas de baixa atividade, que produzem pequenas quantidades de óxido nítrico. Estão presentes no endotélio vascular e no sistema nervoso central. A forma induzida é uma enzima de alta atividade, produzida por fagócitos quando estes são estimulados (Babior, 2000) por produtos microbianos, como o LPS, citocinas, como IFN- γ , FNT- α e IL-1, e o ozônio. Além da função antimicrobiana, o óxido nítrico também apresenta função tumoricida, atua na agregação plaquetária, na vasodilatação e na neurotransmissão. Pode ainda estar envolvido em efeitos deletérios como neurotoxicidade, injúrias associadas à reperfusão, hipotensão grave durante o choque séptico, promoção de angiogênese nos tumores e metástases. Além de estar envolvido nos mecanismos fisiopatogênicos de diversas doenças auto-imunes estudadas em modelos experimentais (MacMicking e cols, 1997; Bogdan, 1998). No sistema imunitário, o óxido nítrico é capaz de regular a atividade, o crescimento e a morte de células envolvidas com a resposta inflamatória, como macrófagos, linfócitos T, células apresentadoras de antígenos, mastócitos, neutrófilos e células NK (Tripathi e cols, 2007b). Durante a infecção por *Leishmania major*, o óxido nítrico se mostrou importante para a regulação da função das células NK na imunidade inata, pois é um co-fator para reações que culminam na produção de IL-12, uma das citocinas determinantes para o estímulo de resposta adaptativa curativa (Bogdan e cols, 2000). Durante a infecção experimental por *Leishmania major*, a resposta que conduz à eliminação do parasito conta com a ativação dos macrófagos pelo IFN- γ e a produção por estes últimos de FNT- α ,

da explosão oxidativa e da atividade da sintase do óxido nítrico induzida na produção de óxido nítrico (Mossalayi e cols, 1999). Tem sido sugerido que a destruição do parasito depende da produção de óxido nítrico pelos macrófagos ativados (Rogers e cols, 2002). Isto está relacionado ao fato de que a expressão da sintase do óxido nítrico induzida permanecer em altos níveis em camundongos resistentes, numa infecção crônica por *L. major*. Uma fonte importante desta enzima são as células dendríticas inflamatórias (Stenger e cols, 1994; De Trez e cols, 2009). Os macrófagos humanos também podem expressar a sintase do óxido nítrico e produzir óxido nítrico, embora os estudos iniciais não pudessem reproduzir os resultados dos modelos experimentais. Esta controvérsia só poderá ser resolvida com a compreensão dos sinais de ativação da enzima em células humanas (Fang, 2004). A destruição das formas amastigotas das leishmânias pelo óxido nítrico pode ocorrer pela indução da apoptose ou pela interferência no metabolismo do parasito, particularmente nos processos de glicólise e respiração celular, sobre enzimas como cis-aconitase, gliceraldeído-3-fostato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase (Sousa-Franco e cols, 2006; Holzmuller e cols, 2006). Os intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio, embora produzidos de forma independente, podem interagir e formar peroxinitritos, que possuem diferentes reatividades, estabilidade, localização celular e atividades biológicas (Fang, 2004) e possuem maior toxicidade do que os intermediários de nitrogênio e oxigênio isoladamente (Erel e cols, 1999).

O parasito apresenta mecanismos de escape dos efeitos deletérios causados pelos intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio o que permite que ele sobreviva no interior dos macrófagos. Dentre estes mecanismos, o

LPG e a gp63 podem inativar ânions superóxido e hidroxila, inibir a NADPH oxidase e inibir a atividade da proteína cinase C, impedindo assim a explosão oxidativa (Cunningham,2002; Denkers e Butcher, 2005; Lodge e cols, 2006, Kavooosi, 2008). Na inibição de moléculas microbicidas pelo parasito, as cascatas de MAP cinase e JAK/STAT são reprimidas, e a atividade de tirosina fosfatases e os níveis de cálcio intracelular se encontram aumentados (Gregory e Olivier, 2005). O parasito ainda conta com peroxidoxinas que reduzem o peróxido de hidrogênio, peróxidos orgânicos e peroxinitritos (Barr e Gedamu, 2003; Abbas e cols, 2008); superóxido dismutases que atuam sobre o ânion superóxido (Plewes e cols, 2003); triparredoxinas que atuam na cascata de eliminação do peróxido de hidrogênio (Romao e cols, 2009) e tripanotionas, que são oxirredutases capazes de regenerar os grupos tióis (Tovar e cols, 1998). Dentre os mecanismos de evasão da resposta imune promovidos pelas leishmânias encontra-se ainda a modulação da produção de citocinas, o que propicia aos patógenos persistirem no interior dos fagócitos. Tanto as formas amastigotas quanto as promastigotas são capazes de diminuir a produção de citocinas do perfil Ta_1 , como IL-12, FNT- α e IFN- γ , e de aumentar a produção de IL-10 e TGF- β (Olivier e cols, 2005).

Nos mecanismos imunológicos direcionados contra a leishmânia, o IFN- γ é a citocina característica de uma resposta do tipo Ta_1 , sendo que, na infecção por *L. major*, pode ser produzido por linfócitos Ta_1 , linfócitos T citotóxicos e células NK, para a ativação dos macrófagos (von Stebut e Udey, 2004). Quando ocorre esta ativação, têm-se a estimulação da sintase do óxido nítrico induzida e a eliminação das formas amastigotas do parasito (Bogdan e cols, 2000). O IFN- γ relaciona-se com a IL-12 por um mecanismo de indução

recíproca, envolvendo os linfócitos T CD4 e as células NK. Além disso, o IFN- γ também pode ter sua produção estimulada pelo FNT- α e, na maioria dos casos, a ação destas citocinas ocorre de forma sinérgica. Já a inibição da produção do IFN- γ ocorre por citocinas do perfil Ta_2 , especialmente a IL-4 (Boehm e cols, 1997). Na formas cutâneo-difusa e visceral da leishmaniose, tem sido sugerido que há ausência da produção de IFN- γ , sendo que esta ausência é considerada como responsável pelo desenvolvimento da doença (Rocha e cols, 1999; Narayan e cols, 2009). Nos estudos com leishmaniose cutânea, a produção de IFN- γ tem sido associada a uma resposta curativa da doença (Cáceres-Dittmar, 1996; Ribeiro-de-Jesus, 1998; Reis e cols, 2009). Esta citocina já foi inclusive empregada para o tratamento de pacientes com leishmaniose cutânea, inclusive em casos de falha do tratamento com antimonial que foram curados (Kolde e cols, 1996; Haas e cols 2002).

O FNT- α também contribui para a destruição da leishmânia, sendo que a atuação desta citocina ocorre de forma sinérgica com o IFN- γ induzindo a produção de óxido nítrico para a destruição de *L. major* (Liew e cols, 1990, Derouich-Guergour e cols, 2001). De fato, a infecção de camundongos resistentes C57BL/6 deficientes na produção de FNT- α por esta espécie de leishmânia ocasionou a forma visceral da doença e morte rápida, possivelmente pela incapacidade de produzir óxido nítrico para destruir os parasitos. Embora estes camundongos desencadeassem uma resposta imune via IFN- γ e expressassem IL-12, a resposta efetora se mostrou ineficiente (Wilhelm e cols, 2001). O FNT- α induz necrose de alguns tumores murinos, *in vivo* e *in vitro*, e caquexia severa, característica de algumas infecções parasitárias. É produzido por macrófagos ativados, em resposta a estímulos

como LPS, e citocinas, como IFN- γ , IL-2, GM-CSF e CSF-1 (Vassali, 1992). Apesar da importância da participação do IFN- γ e do FNT- α na resposta anti-leishmânia (Kemp e cols, 1999), os altos níveis destas citocinas podem estar relacionados com as alterações patológicas encontradas na forma cutâneo-mucosa da doença (Bacellar e cols, 2002; Carvalho e cols, 2007).

A concentração de IL-10 tem se mostrado crítica em vários estudos, tanto na leishmaniose cutânea quanto na visceral, para a sobrevivência inicial e a persistência em longo prazo do parasito em camundongos e seres humanos (Bogdan, 2008). Esta citocina foi inicialmente descrita como sendo produzida pelos linfócitos Ta₂ e limitaria a produção de IFN- γ pelos linfócitos Ta₁. Posteriormente, foi também descrito o seu papel na inibição da produção de FNT- α , IL-12, radicais de oxigênio e em menor extensão de radicais de nitrogênio por macrófagos e/ou células dendríticas. Outras fontes importantes de IL-10 são os macrófagos, as células dendríticas mielóides, os queratinócitos, os linfócitos B e as células NK (Moore e cols, 2001). Deve-se ainda ressaltar a produção desta citocina por populações de linfócitos T regulatórios (T_{reg}), como células T CD4⁺ de ocorrência natural expressando na superfície o marcador CD25 e o fator de transcrição FoxP3 (Belkaid e cols, 2002), e várias subpopulações de células T CD4 induzidas por fatores, como o óxido nítrico, com funções imunossupressoras ou imunorregulatórias (Anderson e cols, 2007; Trinchieri e cols, 2007; Bogdan, 2008). Na dependência da espécie do parasito, do modelo experimental empregado, e da fase da infecção, os linfócitos acima referidos e os macrófagos serão os principais responsáveis pela produção de IL-10 durante a doença, que irá mediar a supressão dos mecanismos imunológicos e, conseqüentemente, a persistência

dos parasitos. Esta persistência poderia estar ligada à estimulação e manutenção dos linfócitos T de memória, mas os estudos a respeito desta relação são controversos (Bogdan, 2008).

1.3- Tratamento

No tratamento das leishmanioses tegumentar e visceral são empregados os antimoniais, que foram as primeiras drogas a serem utilizadas e permanecem nos dias atuais como as drogas de escolha. Os antimoniais são utilizados sob a forma de derivados trivalentes ou pentavalentes, sendo que estes últimos, por serem menos tóxicos, são as drogas de eleição para o tratamento das leishmanioses (Berman, 2003; Tavares, 2007). Os antimoniais pentavalentes são o estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) descoberto em 1936, que é utilizado principalmente em países de língua inglesa e o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) introduzido em 1946, desenvolvido após a segunda guerra mundial, e utilizado em países de língua inglesa, espanhola e também no Brasil (Marsden, 1985; Balaña-Fouce e cols 1998, Tavares, 2007). Embora sejam apontados como as drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses, os antimoniais apresentam limitações na sua utilização, como os graves efeitos colaterais, a necessidade da administração via parenteral (Guerin e cols, 2002; Makle e Markhoul, 2004; Minodier e Parola, 2007; Santos e cols, 2008), resistência dos patógenos e recidivas da doença (Croft e cols, 2006; Yardley e cols, 2006). As drogas de segunda escolha, como a pentamidina e a anfotericina B também apresentam limitações como toxicidade e alto custo (Berman, 2003). Por este motivo, avanços na produção de novas formulações para as drogas utilizadas no tratamento têm ocorrido, e

no caso dos antimoniais pentavalentes, o desenvolvimento de formulações baseadas em lipossomos (Ribeiro e cols, 2008) e em complexos com ciclodextrina nanoestruturados (Frézard e cols, 2008a) têm como objetivo melhorar a sua absorção e biodisponibilidade. Apesar de serem utilizados na clínica a mais de meio século, os antimoniais pentavalentes ainda não possuem a sua estrutura exatamente confirmada, embora estudos envolvendo espectrometria de massa tenham acrescentado novos dados a este respeito (Roberts e cols, 1998; Frézard e cols, 2008b). Da mesma forma, o mecanismo de ação e o metabolismo destas drogas ainda permanecem sob investigação. Dois modelos de mecanismo de ação dos antimoniais têm sido propostos. Em um deles, o antimonial pentavalente é reduzido por grupos tióis ou enzimas como a tiol-dependente redutase e/ou antimoniato redutase ao antimonial trivalente. Este se complexaria com os principais grupos tióis do parasito, como a glutathiona, por exemplo, e seria colocado para fora da célula por uma bomba ou se ligaria a tripanotiona redutase para aumentar a susceptibilidade celular ao estresse oxidativo, ou ainda poderia se ligar a proteínas com motivos “zinc finger”, ejetando o zinco e interferindo assim na expressão de genes essenciais ao parasito. Ainda poderia ocorrer a estimulação dos mecanismos de apoptose. No outro modelo de mecanismo de ação da droga, o próprio antimonial pentavalente se complexaria com biomoléculas do parasito contendo ribose, e este fato poderia levar a uma interferência na produção, transporte ou metabolismo das purinas, o que explicaria a depleção dos níveis de ATP e GTP do parasito. A forma pentavalente do composto também estaria implicada na inibição da enzima DNA topoisomerase I. Nos dois modelos, as reações dos antimoniais acima descritas ocorrem preferencialmente em condições ácidas

de pH, o que favorece a atuação destes compostos sobre as formas amastigotas dos parasitos (Ouellette e cols, 2004; Frézard e cols, 2009).

A atuação dos antimoniais pentavalentes não se resume à destruição direta do parasito, mas também é dependente da influência do sistema imunitário, pela participação de vários fatores como os linfócitos T e as citocinas como constatado em modelos animais (Murray e cols, 1989; Murray, 2001; Gollob e cols, 2008). De fato, o estado imunológico do indivíduo infectado influencia a ação do antimonial pentavalente, como no tratamento da forma cutâneo-difusa e na co-infecção com HIV na forma visceral da doença (Desjeux e Alvar, 2003). No modelo de infecção experimental da leishmaniose visceral, a atividade do antimônio não é direta, mas extremamente dependente da ação das células T do hospedeiro, assim como dos monócitos circulantes do sangue e de citocinas típicas da resposta Ta_1 , como a IL-12 e o IFN- γ (Murray e cols, 1989; Gollob e cols, 2008; Murray e Delph-Etienne, 2000; Murray e cols, 2000a). O FNT- α também tem um papel na ação do antimonial (Murray e cols, 2000b). O requerimento de IFN- γ e FNT- α para a destruição do patógeno aponta para o fato de que estas citocinas influenciadas pelo antimonial poderiam estar estimulando a ativação de macrófagos para a destruição dos parasitos (Murray, 2001).

Mas a influência do antimoniato de meglumina sobre os fagócitos de indivíduos com leishmaniose, as principais células envolvidas na eliminação do parasito, durante o processo infeccioso, não é conhecida. Tem somente sido descrita a atuação da droga, *in vitro*, sobre fagócitos de indivíduos normais, onde se observou a estimulação da fagocitose e o aumento da produção de moléculas microbidas e do FNT- α , pelo antimonial pentavalente (Muniz-

Junqueira e Paula-Coelho, 2008). É possível que a presença do parasito, interagindo com o sistema de fagócitos, possa modificar a resposta imune a ser observada, o que justifica o estudo deste processo. Entre estas funções efetoras dos fagócitos que são relevantes para a investigação encontram-se a fagocitose, a produção de radicais de oxigênio e nitrogênio e a produção de citocinas relevantes na resposta contra a leishmânia. Estes esclarecimentos poderiam acrescentar conhecimentos sobre os mecanismos de eliminação do parasito frente à resposta imune, além de propiciar a compreensão dos mecanismos antiparasitários dos antimoniais, contribuindo para uma terapêutica mais adequada para as leishmanioses.

2-Objetivos

Este trabalho teve como objetivo investigar o efeito do antimoniato de N-metil glucamina sobre as funções de fagócitos. As células analisadas eram provenientes de indivíduos infectados por *Leishmania*, e de modelos murinos BALB/c e C57BL/6 infectados experimentalmente por *Leishmania amazonensis*.

Os objetivos foram desenvolvidos por meio da:

- a) Avaliação da influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina de pacientes com forma cutânea da leishmaniose tegumentar por meio de testes que quantificam a capacidade fagocitária na ausência ou na presença de opsoninas, a produção de peróxido de hidrogênio, de fator de necrose tumoral- α e interleucina-10 pelos monócitos do sangue periférico, como também a produção do interferon- γ .
- b) Comparação da resposta do sistema de fagócitos ao tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina, por camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados pela *Leishmania amazonensis*, por meio de testes que quantificam a capacidade fagocitária, na ausência ou na presença de opsoninas, a produção de peróxido de hidrogênio e a produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais.

3-Métodos

3.1 – Delineamento experimental

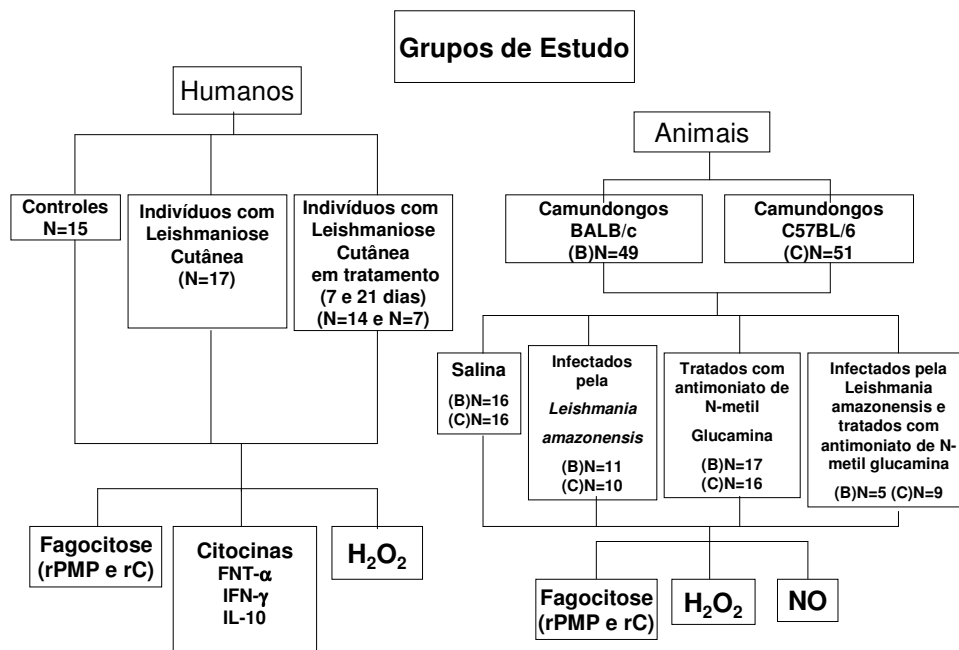


Figura 1: Delineamento dos experimentos

A- ESTUDO EM HUMANOS

3.1a - Grupos de estudo em seres humanos e aspectos éticos

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Imunologia Celular da Área de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília e no Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília, onde foi avaliada a influência do antimoníato de N-metil glucamina sobre as funções de fagócitos utilizando monócitos provenientes do sangue periférico de indivíduos hígidos e de indivíduos infectados com *Leishmania* e de macrófagos peritoneais e camundongos.

As normas éticas para pesquisa científica em seres humanos, estabelecidas pela declaração de Helsinki atualizada (WMA, 2008) e pelo Ministério da Saúde Brasileiro, resolução 196/96 (MS, 196/1996), foram rigorosamente observadas. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (processo número 049/2004) e pelo Comitê de Ética em pesquisa com animais da Universidade de Brasília (processo número 8121/2007) (Anexo).

Foram incluídos no estudo somente os indivíduos que consentiram voluntariamente em participar da pesquisa e que leram e assinaram o termo de consentimento que se encontra no anexo.

Foram estudados 15 voluntários sadios como controles, sendo 7 do sexo feminino e 8 do sexo masculino com média \pm DP de idade de $32,5 \pm 10,1$, variando entre 18 e 52 anos.

Foram avaliados 17 indivíduos com LTA atendidos no Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília que buscavam tratamento para leishmaniose cutânea, sendo 3 do sexo feminino e 14 do sexo masculino, com média \pm DP de idade de $38,1 \pm 14,1$, variando entre 18 e 64 anos. Destes 17 indivíduos que faziam parte do estudo ao início do tratamento, 14 foram avaliados no sétimo dia de tratamento e 7 indivíduos foram avaliados ao final do tratamento. Os indivíduos que durante o tratamento apresentaram alguma forma de complicação, como alterações cardíacas, renais e em níveis enzimáticos e necessitaram interromper o tratamento foram excluídos do estudo no segundo ou terceiro dia de avaliação. Também foram perdidos indivíduos no último dia por não comparecerem ao ambulatório.

Os pacientes foram tratados com 20mg/Kg de antimoniato de N-metil meglumina (Sb^V) – (N-metil glucamina- Glucantime[®]- Aventis) de forma endovenosa por dia durante 21 dias (Paula e cols, 2003) . Foram critérios de inclusão utilizados neste estudo a presença de lesão cutânea característica provocada pela infecção por *Leishmania*, diagnóstico evolutivo e laboratorialmente definido para leishmaniose, ser o primeiro tratamento para a doença, ter sido o antimoniato de N-metilglucamina - Glucantime[®] (Aventis) a droga de escolha para o tratamento e não estar fazendo uso de outra medicação.

Os critérios para o diagnóstico da leishmaniose cutânea incluíram a presença da úlcera característica ao exame clínico e apresentar pelo menos dois dos seguintes testes diagnósticos positivos: teste intradérmico de Montenegro, sorologia, cultura, avaliação histopatológica e resposta clínica ao tratamento.

O sangue era coletado dos indivíduos com LTA, antes, ao sétimo dia, e no último dia de tratamento. Dos 17 indivíduos com LTA cutânea estudados, para 7 a identificação da espécie do parasito foi feita por métodos imunoenzimáticos (Shaw e cols, 1989) e/ou por PCR (Volpini e cols, 2004). Destes, 5 apresentaram infecção por *Leishmania (V) braziliensis* e 2 por *Leishmania (L) amazonensis*.

Foram critérios de exclusão, com base na história clínica, indivíduos que utilizavam outros medicamentos, apresentavam outra patologia concomitante ou doenças possíveis de influenciar as funções do sistema imunitário, como reumáticas, neoplásicas, infecciosas, nutricionais, etc. O sangue foi coletado em vacutainer heparinizado com agulha de coleta múltipla, da região da fossa cubital, com material estéril e descartável, após assepsia com álcool iodado, de voluntários controles e de indivíduos tratados com antimonialato de N-metil glucamina, sendo utilizado para as análises das funções dos fagócitos e para determinação das citocinas.

O presente trabalho foi elaborado e desenvolvido com total isenção de quaisquer conflitos de interesse.

3.2a- Caracterização dos aspectos clínicos dos indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e dos indivíduos controles normais

Os parâmetros clínicos e laboratoriais referentes aos indivíduos com LTA analisados estão listados na tabela 1. Dos dezessete indivíduos com leishmaniose cutânea estudados foram obtidos os seguintes dados referentes ao diagnóstico laboratorial: das 13 impressões por aposição realizadas, 3 mostraram resultados positivos; das 14 culturas para leishmânia realizadas, 4

foram positivas; nos testes histopatológicos, todos os indivíduos mostraram a infiltração de plasmócitos e histiócitos e 3 deles apresentaram presença de parasitos; em 15 testes de Montenegro realizados, 11 mostraram resultados positivos; dos 17 testes sorológicos realizados, 12 mostraram resultados positivos, com títulos variando de 1:40 a 1:320. Os dados referentes aos indivíduos controles sadios se encontram na tabela 2.

Tabela 1: Identificação, idade, sexo, localização e tempo de surgimento das lesões e exames diagnósticos dos indivíduos com leishmaniose cutânea estudados.

Iniciais	Idade (anos)	Sexo	Nº de lesões	Localização das lesões	Tempo de surgimento da lesão	Montenegro	Cultura	Biópsia/ aspirado *	Impressão Por aposição	Imunofluorescência
R R	44	M	1	Perna E	1 mês	15x15 mm	Positivo	*Parasita pos	-	160
P F G	21	M	1	Pênis	-----	-	Negativo	10#	Negativa	Não reagente
F C M S	55	M	1	Tornozelo E	4 anos	7x7mm	Negativo	Parasita neg 2, 5	Negativa	Não reagente
M F R	41	M	1	Perna D	2 meses	19x18mm	Positivo	3 #	Negativa	Não reagente
W M L	18	M	1	Joelho E	6 meses	14x10mm	Positivo	6, 7#	Negativa	80
A P R	53	M	1	Braço D	1 ano	3x3mm	Negativo	Parasita neg 8	Negativa	320
J T L	35	M	1	Perna D	7 meses	3x3mm	Negativo	Parasita neg 1, 2, 9 &	Negativa	160
G M N	37	M	1	Braço E	3 meses	70x50 mm	Negativo	Parasita pos& 10.	Positiva	80
T A L S	39	F	6	Perna D	3 meses	2x3mm	Negativo	Parasita neg 11.	Negativa	Não reagente
R N S	24	M	1	Joelho D	4 meses	10x10mm	Negativo	Parasita neg &10.	Negativa	Não reagente
F C S	39	M	1	Rosto (Maxilar)	3 meses	30x25mm	Negativo	Parasita pos 10.	Negativa	40
Z L D	57	F	1	Braço D	20 dias	18x18mm	-	Parasita pos 11, 6.	-	80
N G M	64	M	1	Mão D	20 dias	20x20mm	-	Parasita neg 2, 5, 9.	-	80
N C C	46	F	1	Tornozelo direito	2 meses	-	Negativo	Parasita neg 2.	Positiva	40
E M	20	M	1	Perna D	6 meses	9x9 mm	-	#	-	80
A O V	34	M	1	Braço D	-----	16x21mm	Negativo	Negativo	Negativa	80
M S A	21	M	1	Perna E	-----	-	Positivo	-	Positiva	-
	38,1 ± 14,1	15 M -3 F	1,29 ± 1,21	6 Perna, 1 Mão, 1 Rosto, 1 Pênis, 2 Tornozelo, 4 Braço	6,7±12,3 meses	11 Positivos 3 Negativos 3 Sem resultado	4 Positivos 10 Negativos 3 Sem resultado	3 Parasito Positivo	3 Positivos 10 negativos 4 Sem resultado	12 Reagentes 6 Não reagentes 1 Não realizado

1. Hiperplasia pseudocarcinomatosa na epiderme; 2. Infiltrado denso linfoplasmocitário ocupando toda a derme; 3. Processo inflamatório crônico não específico; 4. Processo inflamatório; 5. Hiperplasia de epiderme com hiperqueratose; 6. Infiltrado de linfócitos, plasmócitos e histiócitos; 7. Áreas de necrose e células gigantes multinucleadas; 8. Processo inflamatório crônico com intensa reação inflamatória mononuclear e eosinofílica com hiperplasia epitelial reativa; 9. Áreas de necrose na derme; 10. Processo inflamatório granulomatoso; 11. Hiperplasia pseudoepiteliomatosa. # Sugestivo de LTA; & LTA?

Tabela 2: Identificação, idade e sexo dos indivíduos controles que participaram do estudo.

Indivíduos	Idade	Sexo
1	31	M
2	33	F
3	40	F
4	35	F
5	30	M
6	52	F
7	33	M
8	25	F
9	43	F
10	36	F
11	23	M
12	22	F
13	18	M
14	47	M
15	19	M
Total	32.5± 10.1	Masculino = 7 Feminino = 8

3.3a– Concentração do antimoniato de N-metil glucamina para o tratamento de indivíduos com LTA

A apresentação comercial do antimoniato de N-metilglucamina - Glucantime® (Aventis) é em ampolas de 5 mL, sendo que cada 5 mL da preparação contém 1,5 g do sal, correspondendo a 405 mg de antimônio pentavalente (WHO, 2000).

Os indivíduos tratados no ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília recebiam uma dose de 20 mg/Kg/dia de N-metil glucamina, por 21 dias, por via intravenosa, lentamente.

3.4a – Preparação da suspensão estoque de *Saccharomyces cerevisiae* para utilização no teste de fagocitose

Para preparação da suspensão estoque de leveduras foi utilizada a técnica de Lachman e Hobart (1978). Com a preparação das leveduras por esta técnica ocorre uma modificação na superfície do fungo *Saccharomyces cerevisiae* que facilita a adsorção do componente C3 do complemento. Brandi (1993) demonstrou que anticorpos presentes no soro podem também se adsorver às leveduras quando tratadas utilizando-se esta técnica.

Um tablete de 50 g de fermento fresco para pão (Fleischmann) foi dissolvido em 220 mL de STF, pH 7,2, e autoclavado a 121°C em uma atmosfera, por 30 min, e em seguida a suspensão foi lavada com STF, pH 7,2, por várias vezes por centrifugação até obter-se o sobrenadante límpido. O sedimento foi suspenso em 28 mL de STF, pH 7,2, contendo 0,1M de 2-mercaptoetanol e em seguida incubado a 37°C por 2 h em agitação. A

suspensão foi lavada três vezes para retirar o 2-mercaptoetanol e suspensa em 55 mL de solução de iodocetamida 0,02M em STF, pH 7,2. Foi feita outra incubação à temperatura ambiente por 2 h com agitação, e em seguida a suspensão foi lavada três vezes por centrifugação em STF, suspensa em 220 mL de STF e o pH acertado para 7,2. A suspensão era autoclavada novamente por 30 min a 121°C, em seguida lavada por centrifugação até obter um sobrenadante límpido e suspensa em 110 mL de tampão veronal, pH 7,2, contendo 200mg/L de azida sódica, como preservativo. A suspensão estoque preparada foi mantida a 4°C e utilizada até 6 meses após a sua preparação.

3.5a – Preparação das leveduras para uso no teste de fagocitose

Para cada experimento, uma alíquota de 100 µL era retirada da suspensão estoque, o volume completado para 1 mL com STF, e a suspensão lavada três vezes por centrifugação. Após a última centrifugação, as leveduras eram quantificadas em câmara de Neubauer. Para avaliar a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos as leveduras eram em seguida incubadas com soro fetal bovino (Gibco) previamente inativado a 56°C por 30 min, a 10%, em RPMI 1640 (Sigma), pH 7,2, suplementado com 20mM HEPES (Sigma), 26,7mM de NaHCO₃ a 7,5% (Sigma) e 25mg/L de hipoxantina (Schering-Plough) em banho-Maria, a 37°C por 30 min.

Para avaliar a fagocitose pelos receptores para complemento as leveduras eram incubadas a 37°C, por 30 minutos, em banho-Maria, com soro fresco a 10% dos mesmos indivíduos dos quais os fagócitos estavam sendo testados. Todo procedimento era realizado como acima descrito substituindo o soro fetal bovino pelo soro fresco do doador.

3.6a- Separação das células mononucleares do sangue periférico por gradiente de densidade descontínuo com Percoll

O sangue coletado em vacutainer heparinizado era centrifugado a 200g para separação do plasma que era utilizado para sensibilizar as leveduras. A camada de leucócitos era coletada, suspensa ao volume inicial com solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2 e colocada delicadamente sobre o Percoll (GE Health Care Biosciences), densidade 1,077, numa proporção de 5 ml de sangue para 3 ml de Percoll, e centrifugada a 750g por 10 minutos a 4°C, em centrífuga de caçamba móvel. Após a centrifugação, as células mononucleares eram recuperadas e o volume completado para 10ml com STF gelada e centrifugadas a 400g por 10 min, a 4°C para retirada do Percoll. O sobrenadante era desprezado e o volume completado novamente para 10ml com STF gelada e centrifugado por 10 min a 200g, a 4°C, para retirada das plaquetas. O sobrenadante era desprezado e as células mononucleares recuperadas (linfócitos e monócitos) eram suspensas para um volume final de 2 mL com RPMI 1640 (Sigma) gelado, pH 7,2, suplementado com 20mM Hapes (Sigma) e 26,7 mL/L de NaHCO₃ a 7,5% (Sigma). As células mononucleares eram quantificadas em câmara de Neubauer e a viabilidade determinada pela exclusão de nigrosina a 0,05% (Sigma) em STF, pH 7,2 (Muniz-Junqueira e cols, 2001).

A viabilidade das células mononucleares foi sempre superior a 94%, a pureza das preparações acima de 95% por contagem em distendido e a porcentagem de recuperação das CMN acima de 70%.

3.7a- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a capacidade fagocitária dos monócitos de indivíduos com LTA e controles

As células mononucleares obtidas por separação em Percoll, como acima descrito, eram suspensas em RPMI 1640 (Sigma) sem soro fetal bovino e 5×10^5 células mononucleares por orifício, em 500 μ L, eram distribuídas em placas Limbro de cultura de 24 orifícios (TPP - Techno Plastic Products), estéreis, contendo lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro. As células eram incubadas em câmara úmida a 37°C, em 5% de CO₂ em ar por 2 h para permitir a aderência dos fagócitos à lamínula. Os orifícios eram lavados com salina tamponada com fosfato, pH 7,2, para retirar as células não aderidas. Em seguida, para avaliar a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos os macrófagos aderidos eram incubados por 30 min com uma suspensão de 4×10^6 *Saccharomyces cerevisiae* em RPMI 1640 (Sigma) com soro fetal bovino (Sigma) a 10%, previamente inativado, a 37°C, em câmara úmida, em CO₂ a 5% em ar. E, para testar a fagocitose pelos receptores para complemento, o soro fetal bovino era substituído pelo plasma fresco do próprio indivíduo para sensibilizar as leveduras.

Após esse período, os orifícios eram lavados, sendo a última lavagem feita com RPMI 1640 (Sigma) contendo SFB a 30%, com o objetivo de preservar as células para a observação.

As lamínulas eram secas em vento quente, fixadas com metanol absoluto (Vetec) e coradas com Giemsa (Dinâmica) a 10% em tampão para coloração, por 10 minutos. As preparações eram montadas em lâminas com entellan (Sigma) e analisadas ao microscópio óptico. Foram quantificados 200

monócitos por preparação, em campos selecionados aleatoriamente, e calculado o índice fagocitário (IF) pela multiplicação da média de leveduras ingeridas ou fortemente aderidas por monócitos pela proporção de monócitos envolvidos na fagocitose, e os dados foram expressos por 100 monócitos (Shaw e Griffin, 1981).

3.8a - Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção de peróxido de hidrogênio por monócitos de indivíduos com LTA e dos indivíduos controles

A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelos monócitos dos indivíduos com LTA e dos indivíduos normais foi determinada pela técnica descrita por Pick e Mizel (1981) adaptada. O princípio desta técnica baseia-se na oxidação do vermelho de fenol pela peroxidase na presença de H_2O_2 formando um produto lido por colorimetria. As células mononucleares do sangue periférico eram separadas pelo gradiente descontínuo de Percoll, como acima descrito, e mantidas a 4°C até o momento de distribuir na placa de 96 orifícios (TPP), estéril, de fundo chato. As células ($1,5 \times 10^5$ células mononucleares em 200 μ L de RPMI 1640, pH 7,2, sem soro fetal bovino) eram distribuídas, em triplicata, por orifício, nas placas estéreis de cultura. A placa era incubada por uma hora em câmara úmida, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO_2 em ar, para aderência dos monócitos. Após a incubação, os orifícios eram lavados 3 vezes com STF, pH 7,2, a 37°C, e incubadas com vermelho de fenol a 1% e peroxidase tipo 1 RZ 1.3, correspondendo a 19 unidades de purpurogalina/mL (Sigma), na presença ou não de 20nM de acetato de forbol miristato (PMA) (Sigma), por 60 min, em câmara úmida, a 37°C, contendo 5%

de CO₂ em ar. A reação era interrompida com 10 µL de NaOH 1N e, em seguida, a leitura era realizada em espectrofotômetro de placa (Titertek) com filtro de 620 nm. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em micromoles de H₂O₂ (µM). Uma curva-padrão para quantificação do H₂O₂ era preparada de uma solução estoque de H₂O₂ (Sigma) nas concentrações de 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,12 µM, 1,56 µM e 0 µM, com vermelho de fenol acrescido de peroxidase, correspondendo a 19 unidades de pupurogalina/mL.

3.9a- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção de FNT-α e IL-10 pelos monócitos de indivíduos com LTA e de indivíduos controles

Para verificar a influência do tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção do fator de necrose tumoral-α e da Interleucina-10 pelos monócitos dos indivíduos infectados com *Leishmania* e dos indivíduos controles, foram realizados testes imunoenzimáticos no sobrenadante das culturas dos monócitos.

Para estes experimentos, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas conforme descrito anteriormente por gradiente de densidade descontínuo com Percoll e ressuspensas em RPMI 1640 gelado (Sigma) sem soro fetal bovino. As células, na quantidade de 5x10⁵ células por orifício em um volume final de 500 µL, eram distribuídas em placas de cultura de 24 orifícios (TPP) e incubadas por duas horas em câmara úmida, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar, para aderência dos monócitos. Após a incubação, os orifícios eram lavados 3 vezes com STF, pH 7,2, a 37°C para a

retirada das células não aderidas, e em seguida incubadas ou não com 1µg/mL de LPS (Sigma) em RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino por orifício, durante 6 horas em câmara úmida, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar. Este tempo de incubação foi escolhido porque é quando a produção de FNT-α pelos monócitos atinge seu pico máximo e a produção de IL-10 também já é detectada (Matic e cols, 1991; Liese e cols, 2001). O sobrenadante das culturas dos monócitos foi coletado individualmente e congelado a -80°C até a determinação do fator de necrose tumoral alfa e da IL-10 pelo teste de ELISA.

O ensaio imunoenzimático foi realizado em placas de 96 orifícios, utilizando *kits* manufaturados pela Invitrogen (EUA), específicos para a citocina humana, de acordo com as instruções do fabricante. Os testes foram realizados em duplicata e o valor mínimo de detecção pelos *kits* utilizados foram de 1,7pg/mL para o FNT-α e de menos que 1pg/mL para a IL-10. As placas estavam sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-FNT-α ou anti-IL-10 de captura, o tampão de incubação foi colocado em todos os orifícios e os padrões, amostras e controles foram acrescentados e as placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. As placas foram lavadas com o tampão de lavagem e o segundo anticorpo monoclonal anti-FNT-α ou anti-IL-10 ligado a peroxidase foi adicionado, em seguida as placas foram incubadas a temperatura ambiente por uma hora para o FNT-α e por 2 horas para a IL-10 para permitir a formação do sanduíche: (anticorpo monoclonal 1)-(citocina)-(anticorpo monoclonal 2- peroxidase). A placa foi lavada para retirar os anticorpos marcados com peroxidase que não se ligaram às citocinas. Em seguida foi adicionada solução cromógena de tetrametilbenzidina, mais

peróxido de hidrogênio, que reagiram, no escuro, por 30 minutos com a enzima para a revelação dos anticorpos marcados. A reação foi então interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1,8N e a leitura da placa de microtitulação foi feita em espectrofotômetro de placa Spectramax Plus384 (Molecular Devices) no comprimento de onda de 450nm. Uma curva padrão semilogarítmica foi feita pelo programa computadorizado do espectrofotômetro e a densidade óptica convertida em pg/mL de FNT- α e IL-10.

3.10a- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina na produção de IFN- γ pelas células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com LTA e de indivíduos controles

Para verificar a influência do tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção do interferon- γ pelas células mononucleares do sangue periférico (linfócitos e monócitos) dos indivíduos infectados com *Leishmania* e dos indivíduos controles, o teste de ELISA foi realizado no sobrenadante das culturas das células mononucleares após 72 horas de incubação para permitir a proliferação celular. Para este ensaio, as células mononucleares foram separadas em Percoll, como acima descrito, e 5×10^5 células foram distribuídas em placas estéreis de 24 orifícios e incubadas em câmara úmida, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar. Após 2 horas as células mononucleares do sangue periférico (linfócitos e monócitos) foram então estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) (Sigma) (5 μ g/mL) por 72 horas. Após este período, os sobrenadantes das culturas das CMN foram coletados individualmente e congelados a -80°C até a determinação do IFN- γ . O ensaio imunoenzimático foi realizado em placas de 96 orifícios, utilizando um

kit manufaturado pela Invitrogen (EUA), específico para a citocina humana, de acordo com as instruções do fabricante, sendo que os procedimentos empregados foram semelhantes aos descritos anteriormente. O valor mínimo de detecção pelo *kit* utilizado foi de 4pg/mL para o IFN- γ . A leitura das reações e a obtenção dos dados foram realizadas conforme descrito na seção anterior.

B- ESTUDO NO MODELO EXPERIMENTAL

3.1b - Grupos de estudo em camundongos e aspectos éticos

As normas éticas para pesquisa científica com animais de laboratório, definidas pela resolução de 8 de maio de 1979 e pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991) foram rigorosamente observadas.

Foram estudados 49 camundongos BALB/c e 51 camundongos C57BL/6 isogênicos, machos e fêmeas entre 2 e 6 meses de idade, mantidos no alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, em gaiolas coletivas pequenas (com até 5 animais) e grandes (com até 9 animais), com água e ração padronizada *ad libitum*, sob condições de luz e temperatura ambientes, com ciclos de 12 horas claro-escuro. Estes animais foram provenientes de matrizes isogênicas adquiridas na Unicamp.

3.2b- Grupos de estudo em camundongos para avaliação da influência do antimoniato de N-metil glucamina sobre a fagocitose, a produção de peróxido de hidrogênio e a produção de óxido nítrico

Foram estudados 100 camundongos separados nos seguintes grupos: Ccamundongos BALB/c (n=49) e camundongos C57BL/6 (n=51).

Para os camundongos BALB/c os seguintes grupos de camundongos foram estudados:

Grupo 1. Camundongos controles normais tratados com salina (BNS): onde 16 camundongos BALB/c, 10 machos e 6 fêmeas foram tratados com salina 0,9%, por 21 dias, sendo a média±DP do peso do grupo de 26,4±2,9.

Grupo 2. Camundongos normais tratados com N-metil glucamina (BNT): onde 17 camundongos BALB/c, 9 machos e 8 fêmeas foram tratados com 20mg/Kg/dia de antimoniato de N-metil glucamina - Glucantime® (Aventis), por 21 dias. A média±DP do peso deste grupo foi de 26,0±4,6.

Grupo 3. Camundongos infectados com leishmânia tratados com salina (BIS): onde 11 camundongos BALB/c, 7 machos e 4 fêmeas infectados com *Leishmania amazonensis* foram tratados com solução salina conforme descrito anteriormente, sendo a média ±DP do peso de 25,9±3,9.

Grupo 4. Camundongos infectados com leishmânia e tratados com N-metil glucamina (BIT): onde 5 camundongos BALB/c machos infectados com *Leishmania amazonensis* há 2 meses e meio foram tratados com 20mg/Kg/dia de antimoniato de N-metilglucamina - Glucantime® (Aventis) por via IM por 21 dias. A média ±DP do peso deste grupo foi de 28,4±3,4.

A divisão dos grupos de camundongos C57BL/6 foi realizada da seguinte maneira:

Grupo 1. Camundongos controles tratados com salina (CNS): com n=16, sendo 12 machos e 4 fêmeas, tratados com salina por 21 dias. A média ±DP do peso do grupo foi de 24,8±6,4.

Grupo 2. Camundongos controles tratados com antimoniato de N-metil glucamina (CNT): com n=16, tratados com antimoniato de N-metil glucamina sendo 12 machos e 4 fêmeas. A média \pm DP do peso deste grupo foi de $28,7\pm 4,9$.

Grupo 3. Camundongos infectados com leishmânia tratados com salina (CIS): com n=10, sendo 6 machos e 4 fêmeas, infectados com *Leishmania amazonensis*, foram tratados com solução salina conforme descrito anteriormente. A média \pm DP do peso deste grupo foi de $25,8\pm 4,0$.

Grupo 4. Camundongos infectados com leishmânia e tratados com N-metil glucamina (CIT): com n=9, sendo 3 machos e 6 fêmeas, infectados com *Leishmania amazonensis* foram tratados com 20mg/Kg/dia de antimoniato de N-metilglucamina - Glucantime® (Aventis) por 21 dias. A média \pm DP do peso deste grupo foi de $23,1\pm 2,8$.

3.3b – Condições de cultivo e diluição de *Leishmania amazonensis* para as infecções em modelos experimentais

A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* da cepa MHOM/BR/PH8 utilizada nestes experimentos foi proveniente de Belo Horizonte (MG) e foi obtida do Laboratório de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. A cepa era mantida em nitrogênio líquido (-196°C).

Para a preparação do inóculo, as formas promastigotas de *L. amazonensis* criopreservada foi transferida para o meio NNN-LIT (Novy-MacNeal-Nicolle + liver infusion tryptose) e mantida em estufa a 24°C , até que os parasitos alcançassem a fase log de crescimento. Em seguida uma alíquota de 100 μL dessa suspensão era inoculada via subcutânea na pata de hamsters

e após 40 dias as lesões eram puncionadas com solução de NaCl 0,9%. O aspirado era então transferido para o meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino e 0,2% de sulfato de gentamicina e incubado a 24°C por 5 a 7 dias, até que os parasitos atingissem a fase log de crescimento e adquirissem a forma metacíclica. O inóculo foi preparado a partir dessa suspensão. Os animais foram infectados com uma suspensão de 1×10^6 parasitos/mL (Childs 1977), no coxim plantar direito, num volume de 50µL por camundongo.

3.4b – Concentração do antimoniato de N-metil glucamina utilizado no tratamento da infecção dos modelos experimentais

Os camundongos receberam 20mg/Kg/dia de N-metil glucamina, num volume de 100 µL de salina tamponada com fosfato, injetados no coxim plantar por 21 dias consecutivos, após dois meses e meio de infecção, quando ocorria o surgimento da lesão na pata. A coleta dos macrófagos peritoneais foi realizada 7,25±4,5 dias após o último dia de tratamento. O antimoniato de N-metilglucamina - Glucantime® (Aventis) foi fornecido pelo Ministério da Saúde do Brasil.

3.5b - Obtenção dos macrófagos peritoneais

Os animais eram anestesiados com éter etílico, o sangue total era coletado por punção cardíaca e os animais sacrificados por deslocamento cervical. Após a anti-sepsia da parede abdominal com álcool 70%, uma pequena incisão era feita, suficiente para acessar a cavidade abdominal, e

através dela, com pipeta Pasteur estéril, lavava-se o abdômen com 10 mL de STF estéril, gelado, com o objetivo de coletar os macrófagos peritoneais.

O líquido recuperado do lavado peritoneal era centrifugado a 200g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante era desprezado e as células ressuspensas em 2 mL de meio de cultura RPMI 1640, pH 7,2 (Sigma), acrescido de 20mM de HEPES (Sigma) e 27,4 mL/L de NaHCO₃ a 7,5%. Logo após, as células eram quantificadas e a viabilidade era avaliada em câmara de Neubauer, utilizando solução de nigrosina a 0,05% na proporção de 1:5. Após isto, as células eram novamente suspensas em RPMI 1640, pH 7,2, para serem utilizadas nos vários testes funcionais (Muniz-Junqueira e cols, 1992).

3.6b- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina na capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais

O experimento de fagocitose foi realizado conforme o teste descrito no item 3.7a, substituindo as células mononucleares por 2×10^5 macrófagos peritoneais.

3.7b- Preparação do *pool* de plasma fresco para avaliação da fagocitose facilitada por opsoninas

No momento do sacrifício dos animais, coletava-se sangue por punção cardíaca e após centrifugação, utilizava-se o plasma murino a 10% como fonte de complemento para sensibilização das leveduras. O teste de fagocitose

também foi avaliado tanto pelos receptores para padrões moleculares de patógenos (leveduras sensibilizadas com soro fetal bovino inativado) quanto pelos receptores para complemento (leveduras sensibilizadas pelo *pool* de soro fresco dos camundongos).

3.8b- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina na produção de peróxido de hidrogênio em macrófagos peritoneais

O experimento da quantificação de peróxido de hidrogênio foi realizado conforme o teste descrito no item 3.7a, substituindo as células mononucleares por $1,5 \times 10^5$ macrófagos peritoneais.

3.9b- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina na produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais

A produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos peritoneais de camundongos foi avaliada de forma indireta no sobrenadante das culturas utilizando a reação de Griess (Green e cols, 1981), uma vez que esta molécula é instável e rapidamente decomposta em nitrato e nitrito.

Após coleta e processamento dos macrófagos conforme descrito no item 3.5b, $1,5 \times 10^5$ macrófagos em um volume final de 200 μ l de RPMI 1640, pH 7,2, a 4°C, sem soro fetal bovino eram distribuídos, em triplicata, em placas estéreis de cultura com 96 orifícios de fundo chato (TPP). Os macrófagos eram, então, incubados por 1 hora em câmara úmida, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar, para permitir a aderência dos fagócitos.

Após incubação, os orifícios eram lavados 1 vez com STF, pH 7,2, a 37°C, depois incubados por 24 horas com ou sem o estímulo de 10µg/mL de LPS (Sigma), num volume final de 200µl em RPMI 1640, pH 7,2, a 37°C, com 10% de soro fetal bovino.

Após 24 horas de incubação, as placas eram centrifugadas por 10 minutos a 200g e 100µl do sobrenadante das culturas eram transferidos para outra placa, e 100µl do reagente de Griess (1-N naitileno diamina dihidroclorido a 0,1%, sulfanilamida a 1% e H₃PO₄ a 2,5%) era adicionado a cada orifício. A reação era imediatamente lida em espectrofotômetro de placa (Titertek) em comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos em micromolar (µM).

A curva-padrão era elaborada com uma solução de nitrito de sódio (NaNO₂) nas concentrações de 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,12 µM, 1,56 µM e 0 µM.

3.10b- Análise estatística

As análises e os gráficos foram feitos empregando-se o programa Prism[®] 5 Software Package (GraphPad, USA, 2005).

Para a aplicação dos testes estatísticos verificou-se previamente a normalidade ou não das variáveis das amostras. A normalidade das variáveis foi analisada empregando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação entre duas variáveis com distribuição normal foi utilizado o teste t pareado ou o de Mann-Whitney. Os testes estatísticos empregados para a comparação entre mais do que 2 grupos foram o ANOVA ou Kruskal-Wallis,

seguido pelos métodos de Student-Newman-Keuls ou Dunn para as múltiplas comparações entre os grupos, segundo a normalidade das amostras.

As diferenças entre as variáveis comparadas foram consideradas estatisticamente significantes quando a probabilidade bi-caudal da sua ocorrência devida ao acaso (erro tipo I) foi menor que 5% ($p < 0,05$). Os dados foram expressos graficamente como mediana, quartis e extremos.

4-Resultados

4- RESULTADOS

Estudo em seres humanos

Com o objetivo de avaliar a influência da infecção pela leishmânia sobre o sistema de fagócitos, foram comparadas as funções dos fagócitos de indivíduos controles com a dos indivíduos com leishmaniose antes do tratamento. Para verificar a influência do antimoniato de N-metil glucamina sobre a função dos fagócitos, foram comparadas as funções dos fagócitos dos indivíduos com leishmaniose antes do tratamento, com 7 dias e ao seu final.

4.1a- Influência do tratamento com N-metil glucamina sobre a capacidade fagocitária dos monócitos de indivíduos com LTA e indivíduos controles pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos

A capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, como manose e glucana, foi avaliada pelo índice fagocitário, proporção de monócitos envolvidos na fagocitose e média de leveduras ingeridas por monócito, comparativamente, entre indivíduos com LTA antes do tratamento e controles normais, como também antes do tratamento, durante e no último dia. Estes experimentos utilizaram soro fetal bovino inativado, e foram conduzidos utilizando-se uma suspensão de 4×10^6 *Saccharomyces cerevisiae*.

Os indivíduos infectados com *Leishmania* antes do tratamento mostraram uma menor capacidade fagocitária em relação aos controles normais, sendo a mediana do índice fagocitário antes do tratamento (8,95) cerca de 2,5 vezes menor do que a dos controles normais (22) $p=0.02$, teste *t* Student (figura 2, gráfico inferior). Isto ocorreu devido à menor quantidade de

monócitos envolvidos na fagocitose dos indivíduos infectados antes do tratamento (5%) em relação aos indivíduos controles normais (16.5%), $p=0.0005$, teste t Student) (figura 2, gráfico do meio), porque não houve diferença significativa entre as medianas do número de *S. cerevisiae* fagocitadas por monócito do grupo de indivíduos controles normais (1,3) e do grupo de indivíduos infectados com *Leishmania* antes do tratamento (1,5) ($p=0,90$, teste de Mann-Whitney) (Figura 2, gráfico superior). Logo após o tratamento com antimoniato de N-metil glucamina dos indivíduos com leishmaniose, a mediana do índice fagocitário dos monócitos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos aumentou de forma significativa de 8.95 antes do tratamento, para 19,6 no sétimo dia de tratamento com a droga e para 47,5 ao final do tratamento, $p=0.036$, teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn (figura 2, gráfico inferior). Este aumento ocorreu devido à maior quantidade de monócitos envolvidos na fagocitose (de 5% antes do tratamento, para 8,5% com 7 dias de tratamento e para 21,75% ao final do tratamento ($p=0.04$, teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn; figura 2, gráfico do meio). Pois não houve diferença estatística entre as medianas do número de *S. cerevisiae* fagocitadas por monócitos durante o tratamento (1,5 antes do tratamento, 2 no sétimo dia e 1,6 ao final do tratamento, $p=0,47$, teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn; figura 2, gráfico superior).

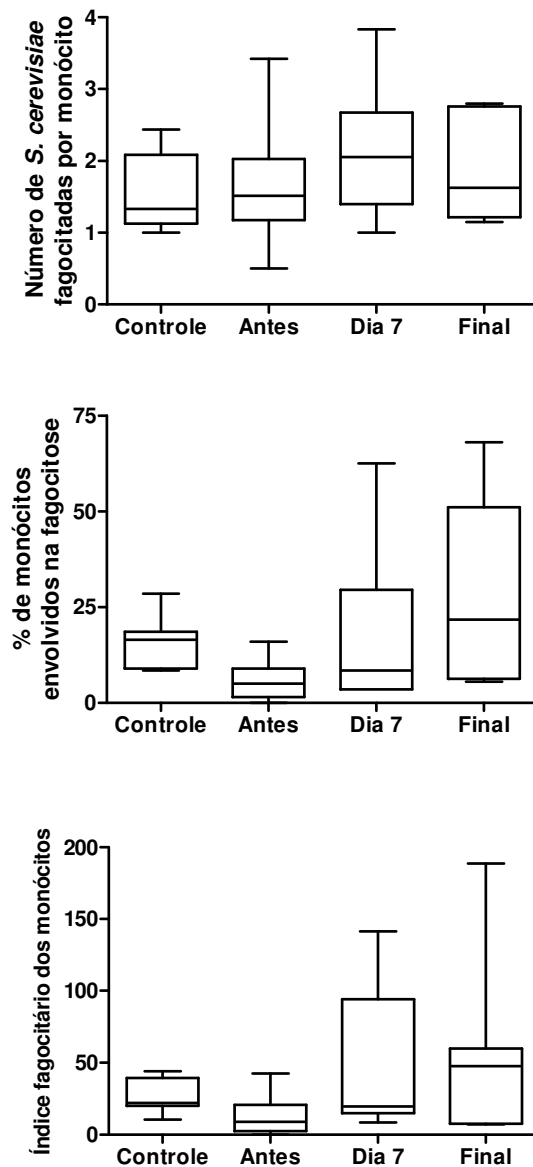


Figura 2: Comparação da capacidade fagocitária de monócitos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos entre indivíduos com leishmaniose cutânea e indivíduos controles normais (controle x antes), e avaliação da influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina na capacidade fagocitária de monócitos de indivíduos com leishmaniose antes, no sétimo dia e ao final do tratamento. Os monócitos foram incubados com 4×10^6 leveduras *S. cerevisiae* não sensibilizadas, por orifício da placa. Os dados foram expressos como mediana, quartis e extremos. Gráfico superior: Média no número de *S. cerevisiae* ingeridas por monócito; controle x antes, teste *t* Student, $p=0,9$; os efeitos da droga foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn ($p=0,47$). Gráfico do meio: Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose; controle x leishmaniose, teste *t* Student, $p=0,0005$; teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn (antes x final, $p<0,05$). Gráfico inferior: Índice fagocitário dos monócitos; controle x leishmaniose, teste *t* Student, $p=0,02$; teste de Kruskal-Wallis ($p=0,03$) seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn (antes x dia 7, $p<0,05$).

4.2a- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a capacidade fagocitária dos monócitos de indivíduos com LTA e indivíduos controles normais pelos receptores para opsoninas

A influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores para opsoninas (componentes do sistema complemento e para a fração Fc da imunoglobulina) também foi avaliada conforme descrito no item anterior, utilizando o plasma fresco dos próprios indivíduos.

Na avaliação da fagocitose pelos receptores para opsoninas, os resultados se mostraram similares aos anteriores para receptores para PMP. A mediana do índice fagocitário dos monócitos do grupo infectado com a *Leishmania* antes do tratamento foi, também, de forma significativa, 2,6 vezes menor (48,6) do que a do grupo de indivíduos controles normais (130) ($p=0.03$, teste de Mann-Whitney) (figura 3, gráfico inferior). Isto ocorreu devido à menor quantidade de monócitos envolvidos na fagocitose (de 23,25% para o grupo dos indivíduos infectados com *Leishmania* antes do tratamento para 33,5% para os indivíduos controles normais; $p=0.03$, teste de t Student, figura 3, gráfico do meio). Porque não houve diferença estatística entre as medianas do número de *S. cerevisiae* fagocitadas por fagócito (2,2 para o grupo dos indivíduos infectados por *Leishmania* e 2,6, para o grupo controle normal), $p=0,37$, teste t Student (figura 3, gráfico superior).

Após o tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina, de forma similar ao observado pela avaliação da fagocitose pelos receptores para PMP, a mediana do índice fagocitário aumentou significativamente de 48,7 antes do tratamento,

para 92,5 no sétimo dia e para 236 ao final do tratamento ($p=0.04$, teste Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn; figura 3, gráfico inferior). Este aumento também se deveu a uma maior quantidade de monócitos envolvidos na fagocitose, que foi de 23,25% para os indivíduos infectados antes do tratamento, 44,25% com 7 dias e 53,75% ao final do tratamento; $p=0.03$, teste ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls de múltiplas comparações; figura 2, gráfico do meio). Não houve diferença estatística entre as medianas dos grupos com relação ao número de *S. cerevisiae* fagocitadas por monócitos durante o tratamento (2,2 para os indivíduos infectados por *Leishmania* antes do tratamento, 2,2 com 7 dias e 3,0 ao final do tratamento; $p=0,63$, teste ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls de múltiplas comparações; figura 3, gráfico superior).

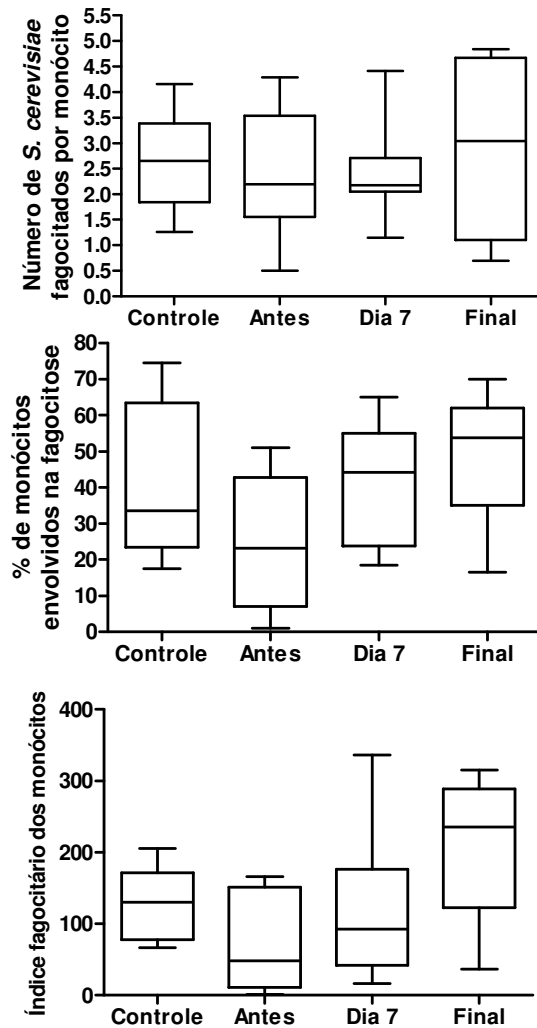


Figura 3: Comparação da capacidade fagocitária de monócitos, pelos receptores para moléculas do sistema do complemento, entre os indivíduos com leishmaniose cutânea e controles normais (controle x antes), e a avaliação da influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a capacidade fagocitária de monócitos de indivíduos com leishmaniose antes, no sétimo dia e ao final do tratamento. Os monócitos foram incubados com 4×10^6 *S. cerevisiae*, sensibilizadas com soro fresco dos próprios doadores, por orifício da placa. Os dados foram expressos como mediana, quartis e extremos. Gráfico superior: Média no número de *S. cerevisiae* ingeridas por monócito; controle x antes, teste *t* Student, $p=0,37$; os efeitos da droga foram avaliados pelo teste ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls de múltiplas comparações ($p=0,63$). Gráfico do meio: Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose; controle x leishmaniose, teste *t* Student, $p=0,03$; teste ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls de múltiplas comparações (antes x dia 7 x final, $p=0,03$). Gráfico inferior: Índice fagocitário dos monócitos; controle x leishmaniose, teste Mann-Whitney, $p=0,03$; teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn (antes x dia 7 x final $p=0,04$).

4.3a- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção de peróxido de hidrogênio por monócitos de indivíduos com LTA e indivíduos controles normais

A produção de peróxido de hidrogênio foi determinada no sobrenadante da cultura de monócitos de indivíduos com LTA antes e durante o tratamento com antimoniato de N-metil glucamina e de indivíduos controles normais por reação colorimétrica conforme descrito anteriormente. Os monócitos dos indivíduos infectados por *Leishmania* antes do tratamento apresentaram uma produção basal de peróxido de hidrogênio significativamente maior ($142\mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5$ monócitos/h) do que os monócitos dos indivíduos controles normais ($63,7\mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5$ monócitos/h; $p = 0,035$, teste de Mann Whitney; figura 4, gráfico inferior). Resultado similar foi observado quando a produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos foi estimulada *in vitro* com PMA, sendo a produção do peróxido de hidrogênio de $145,9\mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5$ monócitos/h para o grupo dos indivíduos infectados por *Leishmania* antes do tratamento e de $37,4\mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5$ monócitos/h para os indivíduos controles normais, $p = 0,033$ teste de Mann Whitney, figura 4, gráfico superior). Embora a mediana da produção basal de peróxido de hidrogênio pelos monócitos dos indivíduos infectados antes do tratamento tenha sido de $142\mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5$ monócitos/h, no sétimo dia de tratamento de $42,6\mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5$ monócitos/h, e no final de tratamento foi de $66\mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5$ monócitos/hora ($p = 0,16$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn; figura 4, gráfico inferior), não houve diferença estatística na produção de peróxido de hidrogênio entre os grupos após o tratamento dos indivíduos com leishmaniose

com antimoniato de N-metil glucamina, pois a dispersão foi muito grande nos grupos estudados.

Da mesma forma, quando os monócitos dos indivíduos infectados e tratados com N-metil glucamina foram estimulados com PMA, os valores das medianas de $146\mu\text{M H}_2\text{O}_2/1.5 \times 10^5$ monócitos/h antes do tratamento, de $64\mu\text{M H}_2\text{O}_2/1.5 \times 10^5$ monócitos/h no sétimo dia de tratamento e $60\mu\text{M H}_2\text{O}_2/1.5 \times 10^5$ monócitos/h ao final do tratamento ($p=0,85$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn; figura 4, gráfico superior) não mostraram diferença estatística, pois a dispersão foi muito grande nos grupos estudados.

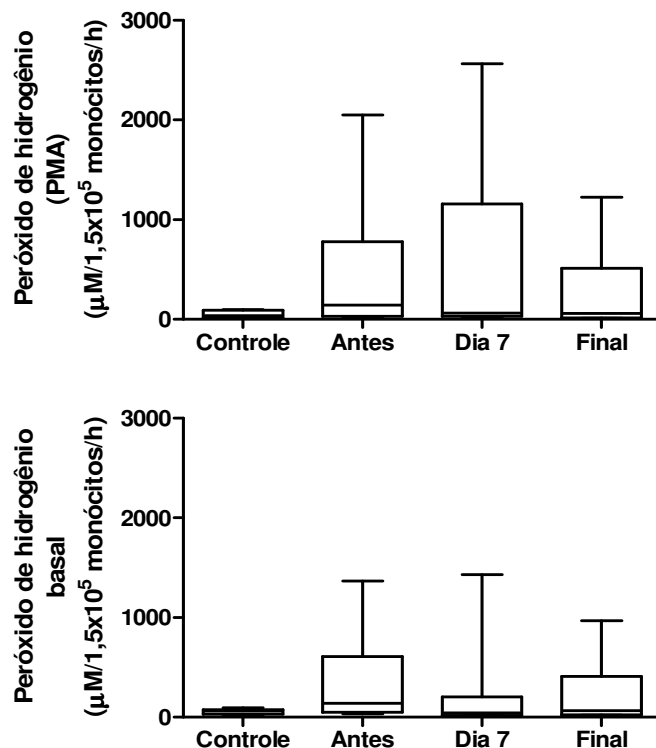


Figura 4: Comparação da produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos de indivíduos com leishmaniose cutânea e de indivíduos controles normais e avaliação da influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção de peróxido de hidrogênio por monócitos de indivíduos com leishmaniose antes, no sétimo dia e ao final do tratamento. A produção foi quantificada pelo método da oxidação do vermelho de fenol dependente de peroxidase. Os dados foram expressos como mediana, quartis e extremos em valores em $\mu\text{M}/1,5 \times 10^5$ monócitos/h de peróxido de hidrogênio. Gráfico superior: produção de peróxido de hidrogênio estimulada por PMA; controle x leishmaniose, Mann Whitney, $p=0,03$. O efeito da droga foi avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn (antes x dia 7 x final, $p=0,85$). Gráfico inferior: produção basal de peróxido de hidrogênio; controle x leishmaniose, Mann Whitney, $p=0,03$. O efeito da droga foi avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn (antes x dia 7 x final, $p=0,16$).

4.4a- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção de FNT- α e IL-10 pelos monócitos de indivíduos com LTA e de indivíduos controles normais

A produção do fator de necrose tumoral- α e da interleucina 10 foi determinada nos sobrenadantes das culturas dos monócitos dos indivíduos controles normais e dos indivíduos infectados por *Leishmania* antes, durante e após o tratamento com antimoniato de N-metil glucamina por ELISA.

A mediana da produção basal de FNT- α pelos monócitos dos indivíduos infectados por *Leishmania* antes do tratamento (149 pg/mL) foi significativamente menor do que aquela observada nos indivíduos controles normais (945 pg/mL) ($p < 0,0001$ teste Mann Whitney; figura 5). Após estímulo dos monócitos com o LPS não houve diferença significante entre as medianas dos dois grupos para produção desta citocina (446 pg/mL para os indivíduos controles e 588 pg/mL para os indivíduos infectados antes do tratamento, teste Mann Whitney, $p = 0,56$; figura 6).

Durante o tratamento com antimoniato de N-metil glucamina dos indivíduos com LTA, a mediana da produção basal do fator de necrose tumoral- α aumentou de 149 pg/mL antes do tratamento para 1782 pg/mL no sétimo dia e foi de 130 pg/mL ao final do tratamento com droga; $p = 0,03$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn (figura 5).

O tratamento com a droga não influenciou a produção do FNT- α quando os monócitos foram estimulados com LPS (588 pg/mL antes do tratamento, 699 pg/mL com 7 dias e 165 pg/mL ao final do tratamento), $p = 0,12$ teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn (figura 6).

Não houve produção basal de IL-10 pelos monócitos da maioria dos indivíduos com leishmaniose, o que não foi diferente do observado para os indivíduos normais (Mann-Whitney, $p=0,3$). O tratamento com o antimonial de N-metil glucamina também não modificou significativamente a produção basal desta citocina (Figura 7 gráfico inferior, $p=0,73$, teste Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn). Após estímulo dos monócitos pelo LPS, não houve diferença entre a produção da IL-10 pelos monócitos dos indivíduos normais e com leishmaniose (Mann-Whitney, $p=0,96$). Após o tratamento houve apenas uma discreta tendência ao aumento da produção da IL-10 pelos monócitos dos indivíduos com leishmaniose no sétimo dia do tratamento com o antimonial, enquanto não houve produção desta citocina ao final do tratamento (Figura 7 gráfico superior, $p=0,08$, teste Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn).

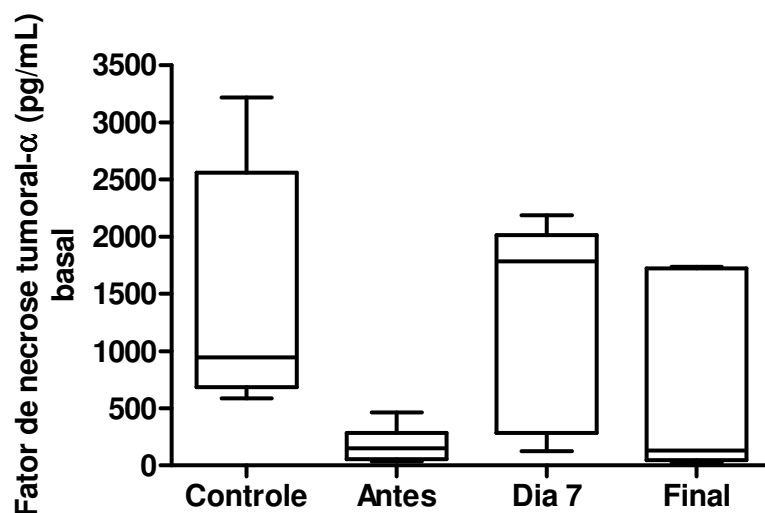


Figura 5: Comparação da produção basal de fator de necrose tumoral- α pelos monócitos dos indivíduos com leishmaniose cutânea e controles normais e influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção desta citocina pelos monócitos dos indivíduos com leishmaniose antes, no sétimo dia e ao final do tratamento. O fator de necrose tumoral- α foi quantificado no sobrenadante das culturas dos monócitos após 6 horas de incubação de 5×10^6 PBMC por orifício da placa, por ELISA. Controle x leishmaniose, teste de Mann-Whitney, $p=0,005$; o efeito da droga foi avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis (antes x dia 7 x final, $p=0,003$; teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn, $p<0,05$ (antes x dia 7)).

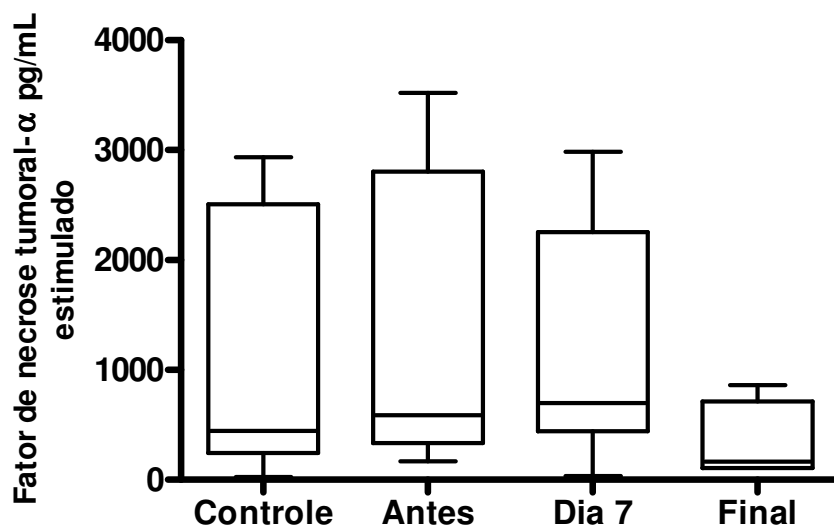


Figura 6: Comparação da produção de fator de necrose tumoral- α pelos monócitos estimulados por LPS ($1\mu\text{g}/\text{mL}$), por 6h de incubação, entre os indivíduos com leishmaniose cutânea e os controles normais e avaliação da influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção desta citocina pelos monócitos dos indivíduos com leishmaniose antes, no sétimo dia e ao final do tratamento. O fator de necrose tumoral- α foi quantificado no sobrenadante das culturas (5×10^6 PBMC por orifício da placa) por ELISA. Controle x leishmaniose, teste de Mann-Whitney, $p=0,56$; o efeito da droga foi avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis (antes x dia 7 x final), $p=0,12$.

4.5a- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção de IFN- γ pelos indivíduos com LTA e controles normais.

A produção de interferon- γ foi determinada no plasma sanguíneo e no sobrenadante da cultura células mononucleares do sangue periférico (linfócitos e monócitos) de indivíduos controles normais e de indivíduos infectados por *Leishmania* antes, com 7 dias e após o tratamento com antimoniato de N-metil glucamina após 72 horas de incubação com fitohemaglutinina.

Houve uma tendência para a mediana da concentração plasmática de interferon- γ ser discretamente maior nos indivíduos com leishmaniose tegumentar (32,5 pg/mL) do que a mediana dos indivíduos controles normais (30,8 pg/mL), $p=0,057$, Mann-Whitney, Figura 8.

Após o tratamento com antimoniato de N-metil glucamina, não houve diferença significativa entre as medianas dos grupos de indivíduos infectados por *Leishmania*, antes do tratamento (32,5pg/mL), no sétimo dia (33,1pg/mL) e ao seu final (31 pg/mL), $p=0,23$, teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn (figura 8).

Quando a produção de interferon- γ foi avaliada no sobrenadante das culturas de monócitos e linfócitos, após 72 h de incubação com fitohemaglutinina não houve diferença estatisticamente significativa entre as medianas da concentração da citocina entre os indivíduos controles normais (52pg/mL) e os infectados antes do tratamento (65pg/mL; $p=0,64$, teste de Mann-Whitney, figura 9). O antimoniato de N-metil glucamina também não influenciou a produção desta citocina pelos monócitos e linfócitos dos

indivíduos com leishmaniose, sendo os valores das medianas com 7 dias de tratamento com a droga de 45 pg/mL e ao final do tratamento de 93 pg/mL; $p=0,45$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn, figura 9).

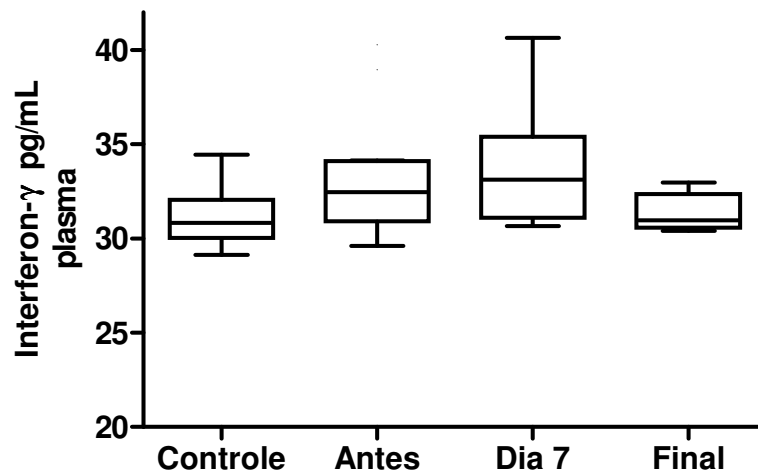


Figura 8: Comparação dos níveis plasmáticos de interferon- γ em indivíduos com leishmaniose cutânea e indivíduos controles normais e avaliação da influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a concentração plasmática da citocina em indivíduos com leishmaniose tegumentar antes, no sétimo dia e ao final do tratamento. Controle x leishmaniose, teste de Mann-Whitney, $p=0,0578$; O efeito da droga foi avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis (antes x dia 7 x final, $p=0,2313$; teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn).

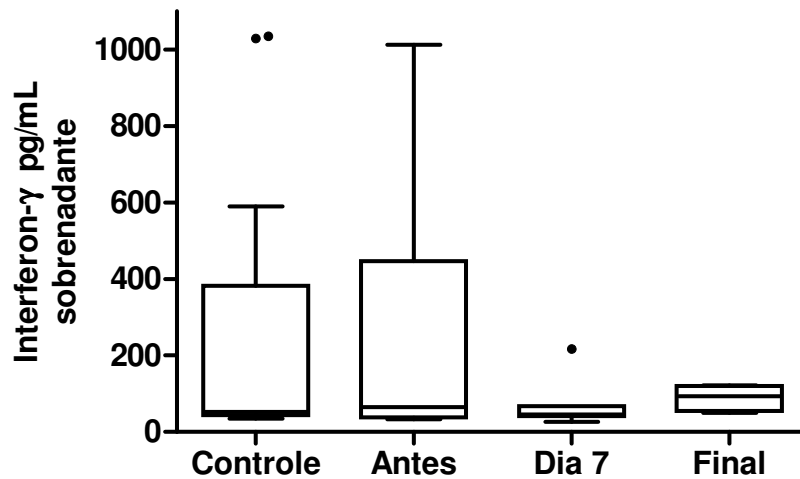


Figura 9: Comparação da produção de interferon- γ pelas células mononucleares do sangue periférico (monócitos e linfócitos) de indivíduos com leishmaniose cutânea e de indivíduos controles normais estimulados com fitohemaglutinina (5 $\mu\text{g/mL}$) e avaliação da influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção da citocina em indivíduos com leishmaniose antes, no sétimo dia e ao final do tratamento. A interleucina-10 foi quantificada no sobrenadante das culturas (5×10^6 PBMC por orifício de placa), por ELISA. Controle x leishmaniose, teste de Mann-Whitney, $p=0,638$; O efeito da droga foi avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis (antes x dia 7 x final, $p=0,45$; teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn). Os pontos isolados representam dados *outliers*.

B- ESTUDO NO MODELO EXPERIMENTAL

4.1 b- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre as funções de macrófagos peritoneais murinos

Com o objetivo de avaliar a influência do antimoniato de N-metil glucamina sobre as funções dos fagócitos, em modelos suscetível (BALB/c) e resistente (C57BL/6) à infecção pela leishmânia, foram avaliadas a capacidade fagocitária e a produção de radicais de oxigênio e nitrogênio pelos macrófagos peritoneais em animais infectados ou não pela *L. amazonensis*. Tendo sido avaliada a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos e receptores para opsoninas e a produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico.

4.2b- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a capacidade de fagocitária dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 pelos receptores para padrões moleculares de patógenos

A capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais pelos receptores para padrões moleculares de patógenos de camundongos BALB/c foi avaliada utilizando 1×10^6 ou 4×10^6 leveduras como partículas a serem fagocitadas, na presença de soro fetal bovino.

Observamos tipos de resposta diferentes para os animais BALB/c e C57BL/6. Enquanto os animais BALB/c infectados com a leishmânia apresentaram uma maior capacidade fagocitária do que os animais normais, não houve diferença estatística entre os grupos para os camundongos C57BL/6.

Quando foram utilizadas 1×10^6 leveduras, os animais BALB/c infectados com a leishmânia (27,25) mostraram um maior índice fagocitário do que os animais não infectados (1,5) e os animais não infectados e tratados com o antimonial (2,25). Após o tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina dos animais infectados houve diminuição do IF para este grupo (Leish+Gluc) (14) ($p=0,033$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn, figura 10, gráfico inferior da esquerda). Estas diferenças no índice fagocitário ocorreram tanto devido ao maior envolvimento de macrófagos na fagocitose quanto ao maior número de partículas fagocitadas por macrófago. As medianas da proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose foram: salina=1; Gluc=1,25; Leish=12,75 e Leish+Gluc=6,5 ($p=0,0279$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparações múltiplas, figura 10, gráfico do meio da esquerda).

As medianas do número de partículas fagocitadas por macrófago foram: salina=1,1; Gluc =1,1; Leish=2,0 e Leish+Gluc=2,5 ($p=0,027$, ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas: salina<Leish+Gluc). Figura 10, gráfico superior da esquerda.

Não houve diferença estatística entre os grupos avaliados para os animais C57BL6. As medianas do índice fagocitário para os grupos foram: salina=5; Gluc=4; Leish=12,75 e Leish+Gluc=12,5 ($p=0,45$, Kruskal-Wallis, figura 10, gráfico inferior da direita). As medianas da proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose para os grupos foram: salina=3,5; Gluc=3,75; Leish=10,5 e Leish+Gluc=5,0 ($p=0,78$, Kruskal-Wallis, figura 10, gráfico do meio da direita). As medianas do número de partículas ingeridas por macrófago para os grupos foram: salina=1,0; Gluc=1,5; Leish=1,4 e Leish+Gluc=1,3

($p=0,45$, ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas). Figura 10, gráfico superior da direita.

Nos experimentos utilizando 4×10^6 leveduras, os animais BALB/c infectados com a leishmânia (33,2) mostraram um maior índice fagocitário do que os animais não infectados (7) e os animais não infectados e tratados com o antimonial (5,5). Após o tratamento com a droga dos animais infectados houve um aumento do IF para este grupo (Leish+Gluc) (41,2) ($p=0,026$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn, figura 11, gráfico inferior da esquerda). Estas diferenças no índice fagocitário ocorreram devido ao maior envolvimento de macrófagos na fagocitose, já que não houve diferença estatística no número de partículas fagocitadas por macrófago entre os grupos. As medianas da proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose foram: salina=5; Gluc=6; Leish=12,2 e Leish+Gluc=18 ($p=0,03$, ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas, figura 11, gráfico do meio da esquerda).

As medianas do número de partículas fagocitadas por macrófago foram: salina=1,4; Gluc=1,5; Leish=2,4 e Leish+Gluc=2,1 ($p=0,16$, ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas). Figura 11, gráfico superior da esquerda.

Não houve diferença estatística entre os grupos avaliados dos animais C57BL6. As medianas do índice fagocitário para os grupos foram: salina=9,5; Gluc=2,5; Leish=14,7 e Leish+Gluc=21,7 ($p=0,15$, Kruskal-Wallis). Figura 11, gráfico inferior da direita. As medianas da proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose para os grupos foram: salina=7,7; Gluc=2,5; Leish=22,7 e Leish+Gluc=15,2 ($p=0,28$, Kruskal-Wallis). Figura 11, gráfico do meio da direita.

As medianas do número de partículas ingeridas por macrófago para os grupos foram: salina=1,6; Gluc=1,5; Leish=1,5 e Leish+Gluc=1,5 ($p=0,93$, ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas).

Figura 11, gráfico superior da direita.

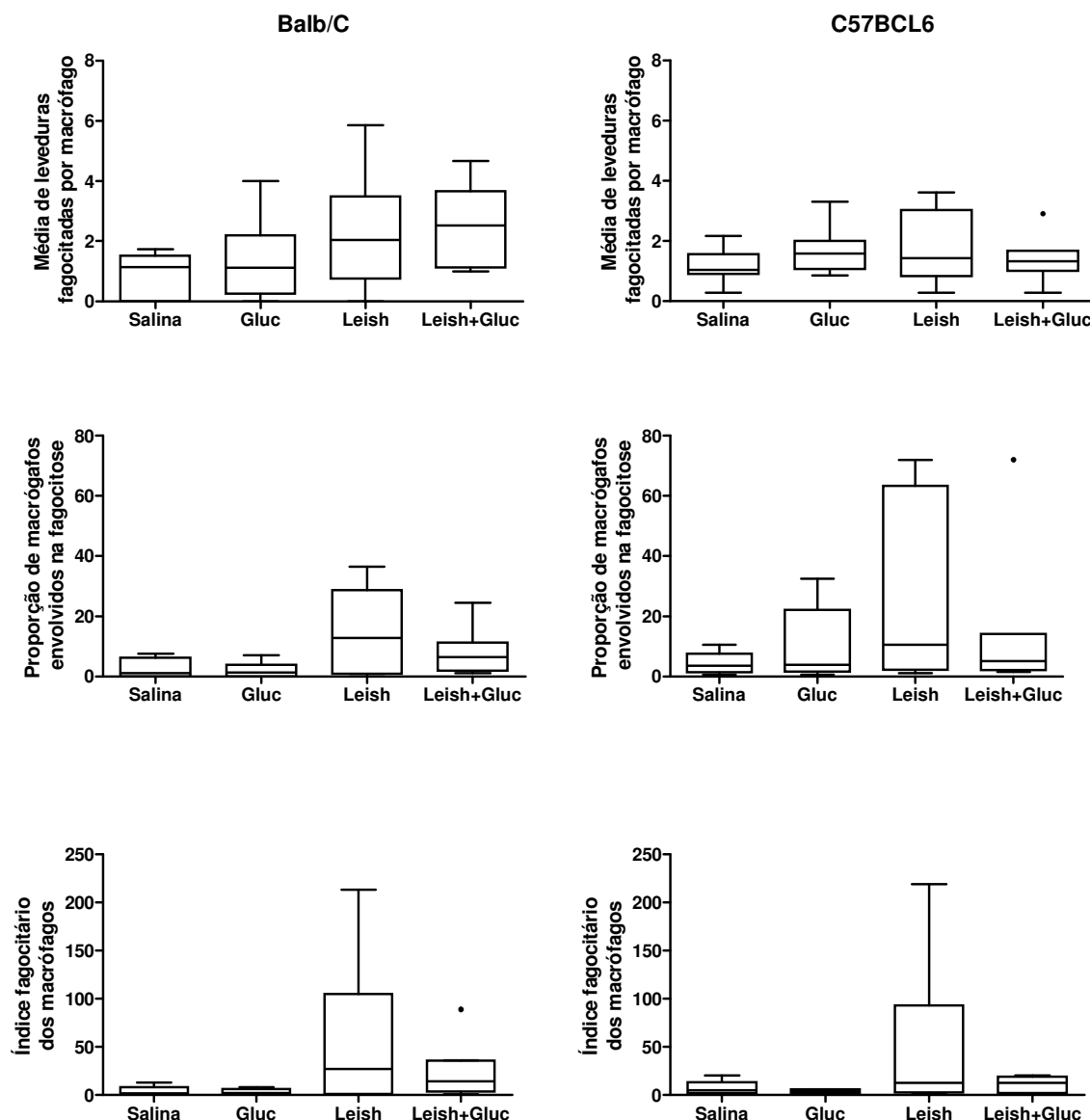


Figura 10: Comparação entre as capacidades fagocitárias dos macrófagos peritoneais provenientes das linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 que receberam salina; que foram tratados com antimoníato de N-metil glucamina (Gluc); que foram infectados com *Leishmania* (Leish) e que foram infectados com *Leishmania* e tratados com a droga (Gluc+Leish). A fagocitose foi realizada utilizando *Saccharomyces cerevisiae* (1×10^6), na presença de soro fetal bovino. Gráficos inferiores: Índice fagocitário (esquerda: $p=0,033$; direita: $p=0,45$; teste Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn); Gráficos do meio: Proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose (esquerda: $p=0,027$; direita: $p=0,78$; teste Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn); Gráficos superiores: Média de leveduras fagocitadas por macrófago (esquerda: $p=0,027$; direita: $p=0,45$; teste ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas). Os pontos isolados representam dados *outliers*. Dados expressos como medianas, quartis e extremos.

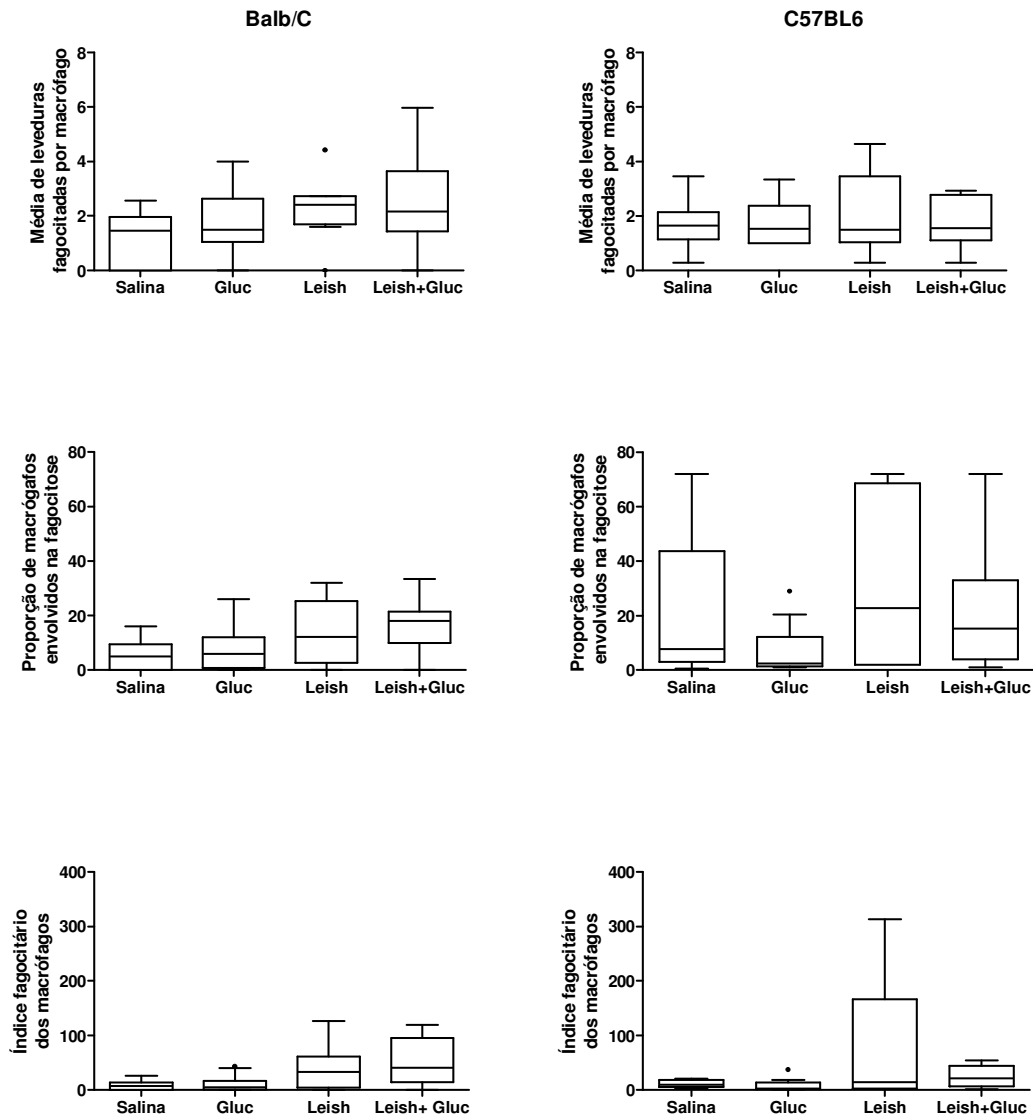


Figura 11: Comparação entre as capacidades fagocitárias dos macrófagos peritoneais provenientes das linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 que receberam salina; que foram tratados com antimoniato de N-metil glucamina (Gluc); que foram infectados com *Leishmania* (Leish) e que foram infectados com *Leishmania* e tratados com a droga (Gluc+Leish). A fagocitose foi realizada utilizando *Saccharomyces cerevisiae* (4×10^6), na presença de soro fetal bovino. Gráficos inferiores: Índice fagocitário (esquerda: $p=0,026$; direita: $p=0,15$; teste Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn); Gráficos do meio: Proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose (esquerda: $p=0,031$; direita: $p=0,28$; teste ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas e teste Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn, respectivamente); Gráficos superiores: Média de leveduras fagocitadas por macrófago (esquerda: $p=0,16$; direita: $p=0,93$; teste ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas). Os pontos isolados representam dados *outliers*. Dados expressos como medianas, quartis e extremos.

4.3 b- Influência do tratamento com N-metil glucamina sobre a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 pelos receptores para opsoninas

A influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais pelos receptores para opsoninas (componentes do sistema complemento e fração Fc da imunoglobulina) foi avaliada pela utilização de um pool de plasma dos próprios animais estudados para sensibilizar as leveduras. Foram utilizadas 1×10^6 ou 4×10^6 leveduras como partículas a serem fagocitadas.

Da mesma forma que na fagocitose por receptores para padrões moleculares de patógenos, observamos os mesmos tipos de resposta para os animais BALB/c e C57BL/6, que foram diferentes entre si. Enquanto os animais BALB/c infectados com a leishmânia apresentaram uma maior capacidade fagocitária do que os animais normais, não houve diferença estatística entre os grupos para os camundongos C57BL6.

Quando foram utilizadas 1×10^6 leveduras, os animais BALB/c infectados com a leishmânia (20,5) mostraram uma tendência para um maior índice fagocitário do que os animais não infectados (8,5) e os animais não infectados e tratados com o antimonial (10). Após o tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina dos animais infectados houve um aumento do IF para este grupo (Leish+Gluc) (102,5) ($p=0,05$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn, figura 12, gráfico inferior da esquerda). Estas diferenças no índice fagocitário ocorreram devido ao maior envolvimento de macrófagos na fagocitose, já que não houve diferença estatística entre os grupos para o número de partículas fagocitadas por

macrófago. As medianas da proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose foram: salina=4,5; Gluc=6,5; Leish=13,5 e Leish+Gluc=18,7 ($p=0,025$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn, figura 12, gráfico do meio da esquerda).

As medianas do número de partículas fagocitadas por macrófago foram: salina=1,4; Gluc=1,5; Leish=1,7 e Leish+Gluc=4,5 ($p=0,21$, teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn). Figura 12, gráfico superior da esquerda.

Não houve diferença estatística entre os grupos dos animais C57BL6 avaliados. As medianas do índice fagocitário para os grupos foram: salina=18; Gluc=16,5; Leish=27,5 e Leish+Gluc=39,5 ($p=0,26$, Kruskal-Wallis). Figura 12, gráfico inferior da direita. As medianas da proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose para os grupos foram: salina=13,25; Gluc=10; Leish=28,5 e Leish+Gluc=29,5 ($p=0,18$, Kruskal-Wallis). Figura 12, gráfico do meio da direita. As medianas do número de partículas ingeridas por macrófago para os grupos foram: salina=1,4; Gluc=1,7; Leish=1,6 e Leish+Gluc=1,6 ($p=0,26$, Kruskal-Wallis). Figura 12, gráfico superior da direita.

Nos experimentos utilizando 4×10^6 leveduras, os animais BALB/c infectados com a leishmânia (100,3) mostraram um maior índice fagocitário do que os animais não infectados (39,5) e os animais não infectados e tratados com o antimônio (29). Após o tratamento com a droga dos animais infectados houve um aumento expressivo do IF para este grupo (Leish+Gluc) (225,3) ($p=0,015$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn, figura 13 gráfico inferior da esquerda). Estas diferenças no índice fagocitário ocorreram tanto devido ao maior envolvimento de

macrófagos na fagocitose quanto ao maior número de partículas fagocitadas por macrófago. As medianas da proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose foram: salina=12; Gluc=19,2; Leish=22,5 e Leish+Gluc=30,7 ($p=0,02$, ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas). Figura 13, gráfico do meio da esquerda.

As medianas do número de partículas fagocitadas por macrófago foram: salina=2,5; Gluc =2; Leish=4,9 e Leish+Gluc=6 ($p=0,01$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn). Figura 13, gráfico superior da esquerda.

Para os animais C57BL6, não houve diferença estatística entre os grupos avaliados. As medianas do índice fagocitário para os grupos foram: salina=49; Gluc=68,5; Leish=68 e Leish+Gluc=81,5 ($p=0,60$, Kruskal-Wallis). Figura 13, gráfico inferior da direita. As medianas da proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose para os grupos foram: salina=31,5; Gluc=29,7; Leish=46 e Leish+Gluc=19 ($p=0,75$, ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas). Figura 13, gráfico do meio da direita. As medianas do número de partículas ingeridas por macrófago para os grupos foram: salina=2,1; Gluc=2,4; Leish=2,4 e Leish+Gluc=1,9 ($p=0,96$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn). Figura 13, gráfico superior da direita. A comparação entre as linhagens de camundongos quanto a proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose mostrou uma mediana maior para o grupo de camundongos C57BL/6 que recebeu salina em relação ao grupo de camundongos BALB/c (0,018; teste de Mann-Whitney).

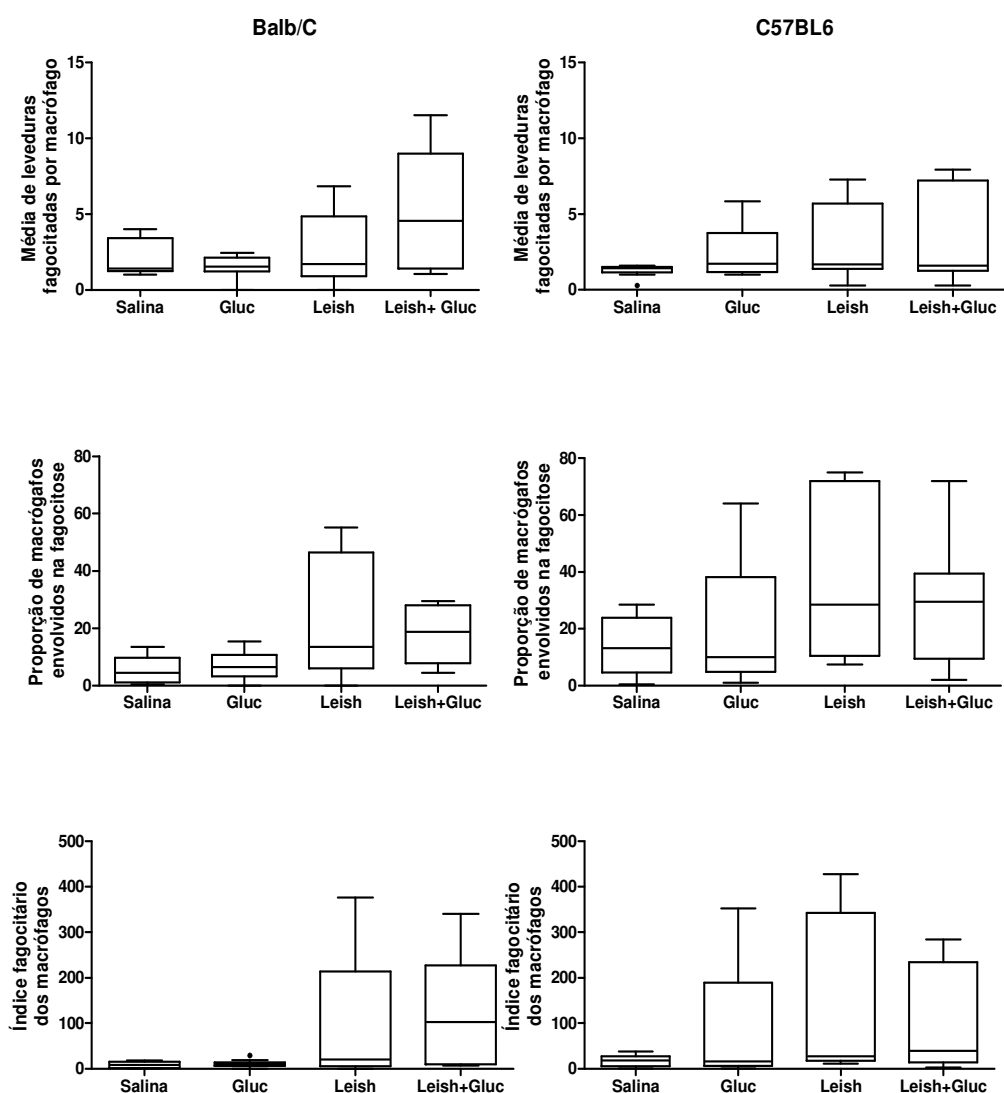


Figura 12: Comparação entre as capacidades fagocitárias dos macrófagos peritoneais provenientes das linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 que receberam salina; que foram tratados com N-metil glucamina (Gluc); que foram infectados com *Leishmania* (Leish) e que foram infectados com *Leishmania* e tratados com a droga (Gluc+Leish). A fagocitose foi realizada utilizando *Saccharomyces cerevisiae* (1×10^6), na presença de pool de plasma dos animais. Gráficos inferiores: Índice fagocitário (esquerda: $p=0,05$; direita: $p=0,25$; teste Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn); Gráficos do meio: Proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose (esquerda: $p=0,02$; direita: $p=0,18$; teste Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn); Gráficos superiores: Média de leveduras fagocitadas por macrófago (esquerda: $p=0,20$; direita: $p=0,26$; teste Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn). Dados expressos como medianas, quartis e extremos.

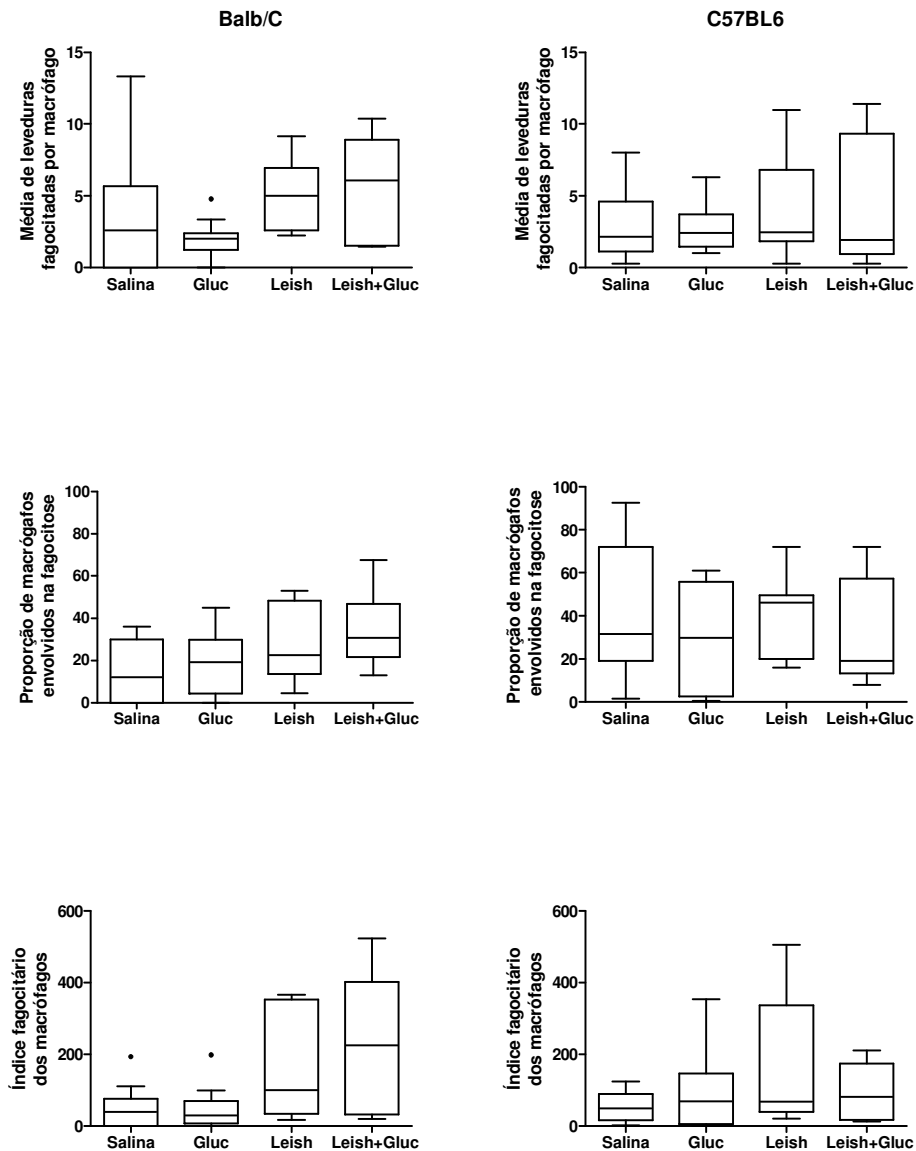


Figura 13: Comparação entre as capacidades fagocitárias dos macrófagos peritoneais provenientes das linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 que receberam salina; que foram tratados com antimoniato de N-metil glucamina (Gluc); que foram infectados com *Leishmania* (Leish) e que foram infectados com *Leishmania* e tratados com a droga (Gluc+Leish). A fagocitose foi realizada utilizando *Saccharomyces cerevisiae* (4×10^6), na presença de pool de plasma dos animais. Gráficos inferiores: Índice fagocitário (esquerda: $p=0,015$; direita: $p=0,60$; teste Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn); Gráficos do meio: Proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose (esquerda: $p=0,02$; direita: $p=0,75$; teste ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas); Gráficos superiores: Média de leveduras fagocitadas por macrófago (esquerda: $p=0,013$; direita: $p=0,96$; teste Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn). A comparação entre as linhagens quanto a proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose mostrou uma mediana maior para os camundongos C57BL/6 que receberam salina em relação aos camundongos BALB/c ($p=0,0181$; teste de Mann-Whitney). Os pontos isolados representam dados outliers. Dados expressos como medianas, quartis e extremos.

4.4b- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção de radicais de oxigênio por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6

A produção de peróxido de hidrogênio foi determinada no sobrenadante da cultura de macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados ou não com *Leishmania amazonensis* e tratados ou não com antimoniato de N-metil glucamina, por reação colorimétrica.

A mediana da produção basal de H₂O₂ pelos macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c foi significativamente maior nos grupos tratados com o antimonial (7,1 μM H₂O₂/1.5x10⁵ macrófagos/h) e nos grupos infectados com a leishmânia, tratados (20,4 μM H₂O₂/1.5x10⁵ macrófagos/h) ou não (13,4 μM H₂O₂/1.5x10⁵ macrófagos/h) com o antimonial, em relação ao grupo controle normal tratado apenas com salina (1,7 μM H₂O₂/1.5x10⁵ macrófagos/h), p=0,0002. Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação múltipla entre os grupos (salina menor que Gluc, Leish e Gluc+Leish) (Figura 14 esquerda). Esta diferença não foi verificada entre os grupos dos animais C57BL6 (salina=7,5 μM H₂O₂/1.5x10⁵ macrófagos/h; Gluc=7,5 μM H₂O₂/1.5x10⁵ macrófagos/h; Leish=30 μM H₂O₂/1.5x10⁵ macrófagos/h; Leish+Gluc=2,1 μM H₂O₂/1.5x10⁵ macrófagos/h), p=0,26, teste de Kruskal-Wallis (Figura 14 direita).

Houve uma tendência para menor produção basal de H₂O₂ pelos macrófagos peritoneais dos camundongos normais tratados com salina suscetíveis a infecção pela leishmânia (BALB/c) (1,7 μM H₂O₂/1.5x10⁵ macrófagos/h) do que a dos animais C57BL/6 (C57BL6) (7,5 μM H₂O₂/1.5x10⁵ macrófagos/h) (p=0.05, Mann-Whitney) (Figura 14). Entretanto, a mediana da

produção basal de H_2O_2 nos animais infectados e tratados com o antimonial foi menor nos animais C57BL6 do que nos animais BALB/c ($p=0,03$, Mann-Whitney) (Figura 14).

Após estímulo com PMA observamos padrão semelhante de resposta (Figura 15). Observamos maior produção do H_2O_2 pelos animais BALB/c infectados (Leish= $31,7\mu M H_2O_2/1.5 \times 10^5$ macrófagos/h; Leish+Gluc= $16,3 \mu M H_2O_2/1.5 \times 10^5$ macrófagos/h) do que no grupo controle normal (salina= $7,5 \mu M H_2O_2/1.5 \times 10^5$ macrófagos/h), $p=0,04$, Kruskal-Wallis. Não houve diferença entre os grupos para os animais C57BL6 ($p=0,63$, Kruskal-Wallis), sendo as medianas: salina= $7,1\mu M H_2O_2/1.5 \times 10^5$ macrófagos/h; Gluc= $9,2\mu M H_2O_2/1.5 \times 10^5$ macrófagos/h; Leish= $19,6\mu M H_2O_2/1.5 \times 10^5$ macrófagos/h e Leish+Gluc= $5,9\mu M H_2O_2/1.5 \times 10^5$ macrófagos/h (Figura 15).

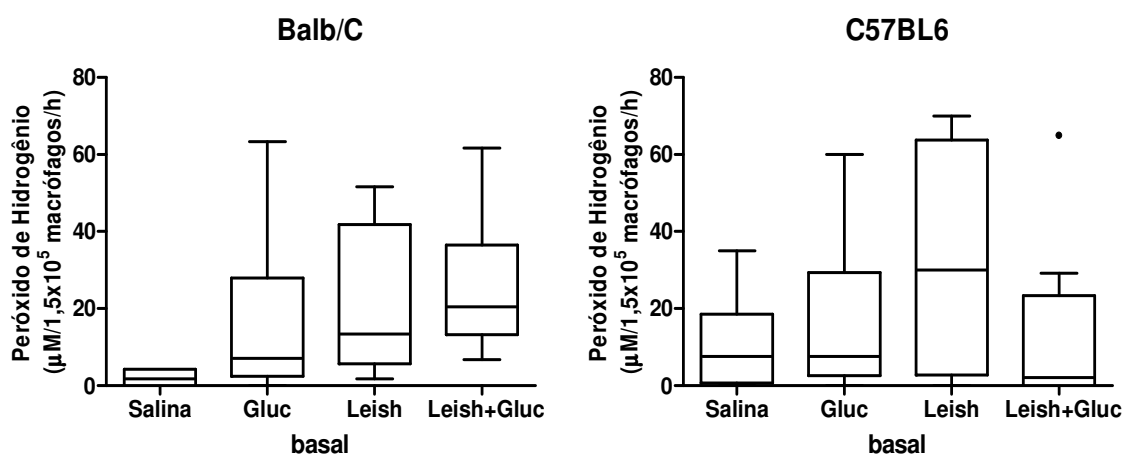


Figura 14: Comparação entre as produções basais de peróxido de hidrogênio dos macrófagos peritoneais provenientes das linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 dos grupos que receberam salina; que foram tratados com o antimoníato de N-metil glucamina (Gluc); que foram infectados com *Leishmania* (Leish) e que foram infectados com *Leishmania* e tratados com a droga (Leish+Gluc). A mediana da produção basal dos camundongos BALB/c foi significativamente maior nos grupos tratados com a droga, e nos infectados tratados ou não em relação ao grupo que recebeu salina ($p=0,0002$ Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação múltipla entre os grupos). As medianas da produção de H_2O_2 pelos macrófagos dos camundongos C57BL/6 não mostraram diferenças significantes entre si ($p=0,26$, teste de Kruskal-Wallis). Os camundongos BALB/c que receberam salina apresentaram uma tendência a uma menor produção do que a dos camundongos C57BL/6 ($p=0,05$, teste de Mann-Whitney). Já a produção basal de peróxido pelo grupo de camundongos infectados e tratados foi menor nos camundongos C57BL/6 do que nos BALB/c ($p=0,03$, teste de Mann-Whitney). O ponto isolado representa dado *outlier*. Dados expressos como mediana, quartis e extremos.

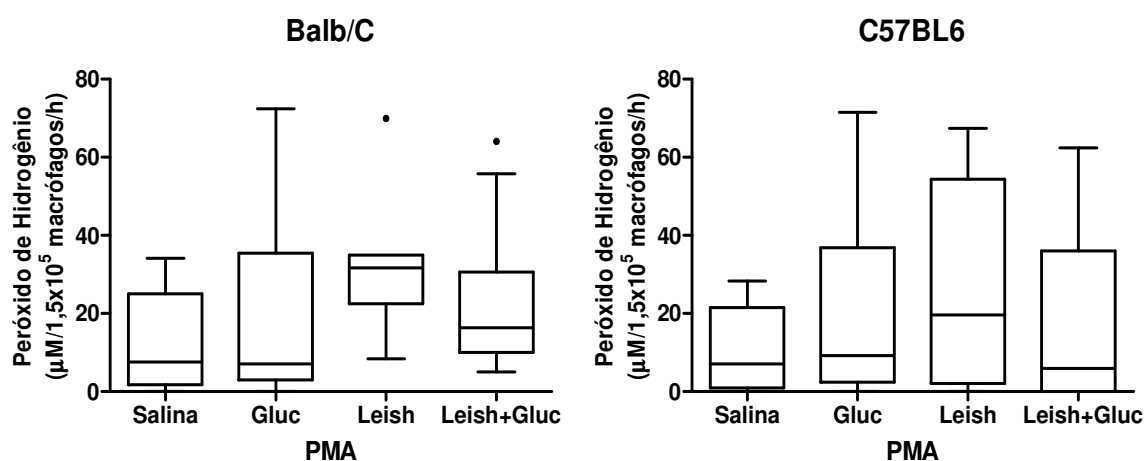


Figura 15: Comparação entre as produções de peróxido de hidrogênio estimuladas por PMA (20nM) pelos macrófagos peritoneais provenientes das linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 pelos grupos que receberam salina; que foram tratados com o antimoníato de N-metil glucamina (Gluc); que foram infectados com *Leishmania* (Leish) e que foram infectados com *Leishmania* e tratados com a droga (Leish+Gluc). Nos camundongos BALB/c houve uma maior produção de peróxido de hidrogênio pelo grupo dos animais infectados do que pelo grupo controle que recebeu salina ($p=0,04$, teste Kruskal-Wallis). Os camundongos C57BL/6 não apresentaram diferenças significantes entre as suas medianas ($p=0,63$, teste Kruskal-Wallis). Os pontos isolados representam dados *outliers*. Dados expressos como mediana, quartis e extremos.

4.5 b- Influência do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina sobre a produção de radicais de nitrogênio (Óxido Nítrico) pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6

A produção de óxido nítrico foi determinada no sobrenadante da cultura de macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados ou não com *Leishmania amazonensis* e tratados ou não com o antimoniato de N-metil glucamina, por reação colorimétrica, pela técnica de Griess.

A mediana da produção basal de NO pelos macrófagos de camundongos BALB/c foi de $0,26\mu\text{M NO}_2^-$ para o grupo que recebeu salina. Observamos tendência de maior produção de NO pelos animais não infectados que foram tratados com antimoniato de N-metil glucamina ($10,22\ \mu\text{M NO}_2^-$). Para o grupo de camundongos que foi infectado com a *Leishmania amazonensis*, a mediana da produção de NO foi de $78,5\mu\text{M NO}_2^-$, e observamos uma tendência para menor produção de NO pelo grupo de camundongos infectados que foram tratados com a droga ($15,9\mu\text{M NO}_2^-$, $p=0,06$; teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn, figura 16, gráfico da esquerda).

Quando as células foram estimuladas com LPS, os camundongos normais não infectados que receberam salina apresentaram produção muito baixa de NO, sendo que em apenas 33% (4/12) dos animais os valores foram detectáveis, sendo a mediana do grupo de $0\mu\text{M NO}_2^-$, semelhante aos valores observados para os camundongos tratado com o antimoniato de N-metil glucamina ($1,7\mu\text{M NO}_2^-$). A produção de NO pelo grupo de camundongos BALB/c infectados pela *L. amazonensis* foi muito variável, sendo que a

concentração do NO para alguns animais foi muito alta, mas a mediana da produção foi de $2,97\mu\text{M NO}_2^-$, menor do que a observada para o grupo de camundongos infectados e tratado com a droga, que foi de $13,0\mu\text{M NO}_2^-$, ($p=0,043$; teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn (salina<Leish+Gluc), figura 17, gráfico da esquerda).

Na análise das medianas da produção basal de óxido nítrico por macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6, não foi possível detectar diferenças significantes entre as medianas dos grupos de camundongos, sendo que para o grupo que recebeu salina, esta foi de $7,4\mu\text{M NO}_2^-$, para os camundongos tratados com o antimoniato de N-metil glucamina foi de $2,4\mu\text{M NO}_2^-$, para o grupo dos camundongos infectados por *L. amazonensis* foi de $9,5\mu\text{M NO}_2^-$ e para o grupo de animais infectados e tratados com a droga, foi de $10,9\mu\text{M NO}_2^-$, ($p=0,76$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn, figura 16, gráfico da direita).

Quando as células foram estimuladas com LPS, as medianas da produção de NO pelos macrófagos peritoneais dos grupos de camundongos normais tratados com salina ou com o antimonial foram muito baixos, sendo a mediana de $0\mu\text{M}$ para ambos os grupos. A mediana da produção de NO do grupo que foi infectado pela *L. amazonensis* foi de $13,8\mu\text{M NO}_2^-$, e no grupo infectado e tratado com a droga a mediana da produção de NO foi de $6,7\mu\text{M NO}_2^-$, $p=0,0413$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn, figura 17, gráfico da direita).

As duas linhagens de camundongos estudadas (BALB/c e C57BL/6) mostraram produção de óxido nítrico diferente. Não houve diferença na produção basal do NO entre os dois grupos, entretanto, embora sem

significância estatística, no grupo infectado pelo protozoário, metade dos animais BALB/c mostraram produção muito exacerbada desta molécula, enquanto nenhum animal C57BL6 mostrou produção muito elevada desta molécula, embora, mais elevada do que o grupo não infectado. Os valores das medianas foram de $78,5\mu\text{M NO}_2^-$ para a linhagem BALB/c e de $9,5\mu\text{M NO}_2^-$ para a linhagem C57BL/6 ($p=0,22$, teste de Mann-Whitney, figura 16).

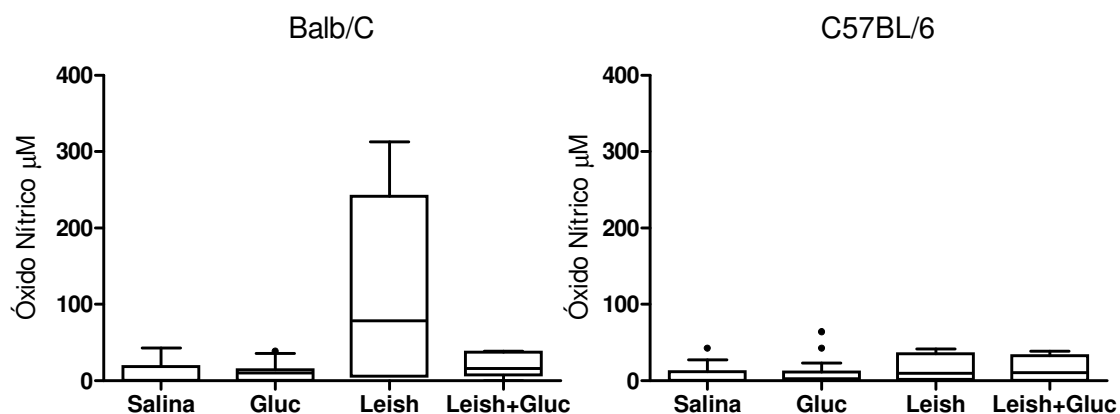


Figura 16: Comparação entre as produções basais de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais provenientes das linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 entre os grupos que receberam salina; que foram tratados com antimoniato de N-metil glucamina (Gluc); que foram infectados com *Leishmania* (Leish) e que foram infectados com *Leishmania* e tratados com a droga (Leish+Gluc). Para os animais BALB/c houve uma tendência a uma maior produção do NO pelo grupo de camundongos que foi tratado com a droga, em relação ao grupo que recebeu salina. Houve uma tendência a uma menor produção de NO pelo grupo infectado que foi tratado com a droga, em relação ao grupo infectado ($p=0,06$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn). Já para os animais C57BL/6, não foi possível identificar diferenças significantes entre as medianas dos grupos ($p=0,76$, teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn). Não houve diferença na produção basal de NO dos dois grupos. Embora, sem significância estatística, metade do número dos camundongos BALB/c do grupo infectado apresentou produção exacerbada de NO, o que não ocorreu com os animais infectados da linhagem C57BL/6 ($p=0,22$, teste de Mann-Whitney). Os pontos isolados representam dados *outliers*. Dados expressos como mediana, quartis e extremos.

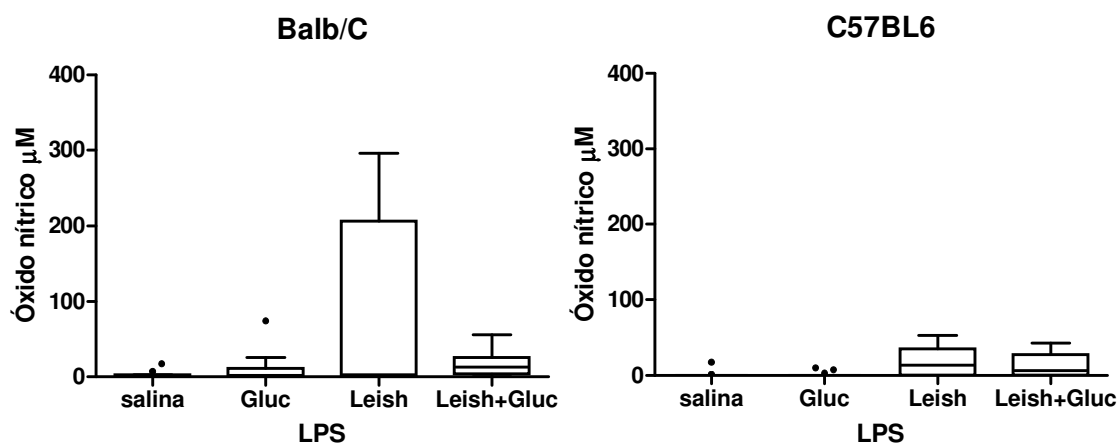


Figura 17: Comparação entre as produções de óxido nítrico estimuladas por LPS (10µg/mL) pelos macrófagos peritoneais provenientes das linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 entre os grupos que receberam salina; que foram tratados com antimoniato de N-metil glucamina (Gluc); que foram infectados com *Leishmania* (Leish) e que foram infectados com *Leishmania* e tratados com a droga (Leish+Gluc). Os animais BALB/c do grupo que recebeu salina apresentaram uma produção muito baixa de NO, semelhante a produção do grupo tratado com a droga. Já a produção do grupo de camundongos infectados e tratados com a droga foi maior do que a do grupo dos camundongos infectados ($p=0,043$, teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn). Já para os animais C57BL/6, as medianas da produção de NO dos grupos que receberam salina e que foram tratados com a droga foram muito baixos, enquanto que a produção de NO pelo grupo de camundongos infectados e tratados com a droga foi mais baixa que a do grupo de camundongos infectados ($p=0,043$, teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn). Os pontos isolados representam dados *outliers*. Dados expressos como mediana, quartis e extremos.

5-Discussão

5.1- Estudo em seres humanos

Os monócitos e macrófagos desempenham um papel central na defesa contra leishmânia (von Stebut, 2007b; Murray, 2000). Durante a infecção estas células são submetidas a diferentes influências, como o efeito de citocinas (Sacks e cols, 2002) que podem alterar as suas funções. Desta forma, uma melhor compreensão das funções de monócitos e macrófagos, os principais tipos celulares envolvidos na defesa contra este parasito (Teixeira e cols, 2006), tanto devido à própria infecção como pela influência do antimoniato de N-metil glucamina, a droga mais utilizada no tratamento das leishmanioses (Croft e cols, 2006), pode ajudar a desenvolver cuidados clínicos mais eficientes e adequados para os pacientes e esclarecer a respeito do mecanismo fisiopatológicos da doença. Para isto, o presente estudo avaliou a influência do tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina sobre as funções de monócitos de indivíduos com leishmaniose cutânea com o objetivo de contribuir para a melhor compreensão da ação desta droga sobre as principais células efetoras da resposta inata envolvidas na defesa contra a leishmânia. As funções dos fagócitos foram comparadas entre os indivíduos com leishmaniose e indivíduos controles para esclarecer as alterações ocorridas durante a infecção pela leishmânia. Além disto, as funções dos fagócitos foram avaliadas durante o período do tratamento a fim de verificar a influência do N-metil glucamina nos fagócitos que já têm a sua resposta imune alterada devido à infecção.

Os estudos anteriores que avaliaram as funções de componentes do sistema imunitário durante a infecção por este parasito e avaliaram a influência do tratamento com antimonial, investigaram em sua maioria, a proliferação

linfocitária e a produção de citocinas, ou estudaram a influência da droga sobre fagócitos de indivíduos normais (Muniz-Junqueira e Coelho, 2008), portanto, que é de nosso conhecimento, esta é a primeira investigação sobre a função de fagócitos de indivíduos infectados na vigência do tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina.

Os monócitos foram utilizados para testar estas funções porque são as células que são expostas ao antimoniato de N-metil glucamina no sangue circulante antes da sua migração para os tecidos e, adicionalmente, são as células do sangue que desempenham um papel primordial nas defesas iniciais e subsequentes contra as leishmânias, além de participarem na formação do granuloma característico destas respostas (Cervia e cols, 1993).

A fagocitose foi avaliada por meio dos receptores para padrões moleculares de patógenos e por receptores para o sistema complemento utilizando *Saccharomyces cerevisiae* previamente incubados com soro fetal bovino ou com plasma fresco humano, respectivamente, porque estes são os principais receptores pelos quais as leishmânias são fagocitadas (Wilson e cols, 1988; Laufs e cols, 2002; Kropf e cols, 2004). Já as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* mortas foram utilizadas como partículas a serem fagocitadas porque estas são ingeridas pelos monócitos utilizando receptores da superfície da membrana (Underhill e Ozinski, 2002) que se ligam a padrões moleculares de patógenos e a frações do sistema complemento (Muniz-Junqueira e cols, 2003), os quais são os mesmos utilizados para a ingestão das leishmânias (Handman e Bullen, 2002). Além disto, se a leishmânia fosse empregada como partícula a ser fagocitada a fim de se avaliar a influência do antimonial de N-metil glucamina na capacidade fagocitária dos monócitos, a

influência do próprio parasito sobre o fagócito interferiria na verificação dos efeitos da droga.

A fagocitose das leishmânias pode se dar por enrolamento, que culmina na localização citoplasmática do parasito no interior do fagócito (Rittig e cols, 1998) ou de forma tradicional, ativa, com gasto de energia, mobilização de componentes do citoesqueleto do fagócito, e localização do parasito dentro do vacúolo fagocítico (Love e cols, 1998). Além disto, deve-se levar em conta que a fagocitose das formas promastigotas e amastigotas irão elicitar diferentes respostas imunes por parte dos fagócitos (Kima, 2007). No presente estudo, foi avaliada a fagocitose ativa.

Nossos dados mostraram que a capacidade fagocitária dos monócitos dos indivíduos com leishmaniose cutânea foi significativamente menor do que a dos indivíduos controles, tanto pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos quanto pelos que reconhecem frações do sistema complemento. Isto ocorreu devido ao menor envolvimento quantitativo dos fagócitos na fagocitose. As razões para este efeito não são claras; uma explicação possível é que a infecção pela leishmânia possivelmente iniba a quimiotaxia destes fagócitos. De fato, foi demonstrado que a infecção por leishmânia impede a função da integrina β -1 e a expressão de receptores de quimiocinas nos fagócitos mononucleares. A expressão de CCR4 e CCR5, dois receptores para quimiocinas, mostrou ser regulada negativamente após 16 horas de infecção (Pinheiro e cols, 2006), o que pode influenciar na quimiotaxia e migração de monócitos, e na resultante resposta inflamatória (Carvalho e cols, 2004). Além disto, outros aspectos funcionais dos fagócitos podem ser modificados pelos parasitos. O lipofosfoglicano (LPG), o maior glicoconjugado

de superfície das formas promastigotas da leishmânia, exerceria seu efeito por influenciar a actina evitando a formação do fagolisossoma, via ação sobre os aglomerados de lipídeos da membrana (Winberg e cols, 2009), o que também poderia impedir a fagocitose destas células. Adicionalmente, foi demonstrado que o fator de necrose tumoral- α pode modificar a função de macrófagos dependendo da sua concentração, e um efeito inibitório na fagocitose foi verificado na presença de uma baixa concentração de FNT- α (Muniz-Junqueira e cols, 2001), sendo que observamos neste trabalho um decréscimo na produção basal de FNT- α pelos indivíduos portadores de leishmaniose. A produção estimulada desta citocina não foi modificada pela infecção pela leishmânia. Uma possível razão para este efeito na produção basal seria devido à capacidade do FNT- α induzir a produção de citocinas inibitórias, como o TGF- β (Bogdan e Nathan, 1993). Adicionalmente, embora a infecção por leishmânia possa inibir a produção de FNT- α *in vitro*, ocorre o efeito contrário na infecção por *Leishmania donovani* e *Leishmania major* nos primeiros estágios da infecção (Olivier e cols, 2005). Em outro estudo, determinando a produção desta citocina em plasma de pacientes com leishmaniose cutânea por quimioluminescência, a infecção pelo parasito também aumentou o nível de FNT- α (Kocyigit e cols, 2002), diferente dos resultados por nós observados. Uma possível explicação para estas diferenças seria a espécie de parasito estudada, a metodologia de detecção das citocinas e diferentes células produtoras das citocinas. Em estudos comparando duas espécies causadoras de leishmaniose cutânea no Brasil, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, os aspectos clínicos como características e número das lesões, resultados de exames diagnósticos e a resposta ao tratamento com o

antimoniato de N-metil glucamina mostraram diferenças (Romero e cols, 2001a; Romero e cols, 2001b). Portanto, o mesmo pode ocorrer com a resposta imune.

Não houve produção basal de IL-10 no sobrenadante das culturas de monócitos pela maioria dos indivíduos analisados infectados ou não. Após estímulo pelo LPS, poucos indivíduos mostraram produção, que não foi estatisticamente diferente entre os grupos estudados, infectados ou não pela leishmânia. Diferente de nossos resultados, Reis e cols (2009) mostraram produção mais elevada de IL-10 pelos indivíduos com leishmaniose do que os controles normais. Entretanto, estes autores utilizaram uma população de células mononucleares do sangue periférico, que é composta por linfócitos e monócitos, diferente dos nossos experimentos, no qual utilizamos as células mononucleares aderidas, que corresponde à uma população principalmente de monócitos. Visto que a IL-10 pode ser produzida por outros tipos celulares, como os linfócitos B (Moore e cols, 1993), nossos dados sugerem que a produção da IL-10 é pequena pelos macrófagos dos indivíduos com leishmaniose, não excluindo, entretanto, que esta citocina possa ser produzida por outros tipos celulares.

Outra citocina característica do perfil Ta1 e que pode controlar a atividade dos fagócitos é o IFN- γ (Manna e cols, 2008), e a presença no plasma sanguíneo e no sobrenadante das culturas das células mononucleares do sangue periférico (linfócitos + monócitos) foi quantificada em nosso trabalho. Não houve diferença entre os grupos na produção do IFN- γ presente no sobrenadante das culturas de monócitos e linfócitos. Os indivíduos infectados pela leishmânia mostraram níveis plasmáticos discretamente maiores do que

os indivíduos normais. Entretanto, embora no limite da significância estatística, não é possível definir se esta pequena diferença de 1,7 pg/mL nos valores da citocina observados no sangue circulante tem algum significado biológico. Tem sido mostrado presença do mRNA do IFN- γ nas lesões ativas de pacientes com leishmaniose cutânea (Cáceres-Dittmar e cols, 1993; Pirmez e cols, 1993), e produção por células mononucleares de sangue periférico estimuladas com antígenos de leishmânia em pacientes com a forma cutânea da doença também foi detectada (Bittar e cols, 2007; Reis e cols, 2009). É possível que as diferenças observadas com os nossos resultados devam-se a infecção por diferentes espécies do parasita.

Nossos dados mostraram que a administração do antimoniato de N-metil glucamina aos indivíduos com leishmaniose causou um aumento significativo na fagocitose dos monócitos, tanto pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, quanto pelos receptores para frações do sistema complemento, e este aumento já pôde ser observado no sétimo dia de tratamento. O aumento da capacidade fagocitária dos monócitos deveu-se ao aumento no número de monócitos envolvidos na fagocitose. Uma possível explicação para este efeito seria o aumento da quimiotaxia dos fagócitos pelo antimoniato de N-metil glucamina.

Adicionalmente, observamos que o tratamento com o antimonial também causou um aumento significativo na produção basal do fator de necrose tumoral- α no sétimo dia de tratamento, que decresceu a níveis próximos da produção dos indivíduos infectados no último dia de tratamento. A produção sob estimulação desta citocina não foi modificada pelo tratamento. De fato, tem sido demonstrado que a adição de FNT- α às culturas de monócitos

humanos pode aumentar a capacidade fagocitária destas células (Muniz-Junqueira e cols, 2001). Desta forma, a droga poderia estar estimulando a fagocitose indiretamente. Estes fatores em conjunto com a ação direta do antimoniato de N-metil glucamina sobre o parasito culminariam na defesa contra os microrganismos presentes no indivíduo ao final do tratamento. Nossos dados estão de acordo com observações *in vitro* de que o tratamento com o antimonial aumenta a fagocitose (Muniz-Junqueira e Paula-Coelho, 2008) e *in vitro* e *in vivo* a produção de FNT- α (Muniz-Junqueira e Paula-Coelho, 2008; de Moura e cols, 2008).

Quanto à produção de IL-10, nossos dados sugerem que o tratamento com o antimonial não influenciou a produção basal ou estimulada da citocina pelos monócitos humanos.

O tratamento com o antimonial não influenciou a produção de IFN- γ , tanto no plasma sanguíneo quanto no sobrenadante das culturas de monócitos e linfócitos. Em estudos utilizando células mononucleares do sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea estimuladas com antígeno de leishmânia após o término do tratamento com antimoniato de N-metil glucamina, em tempos variando de uma semana até dezessete anos após o término do tratamento, a produção de IFN- γ se mostrou ou inalterada pela terapia (Da Cruz e cols, 2002) ou aumentada ao final do tratamento (Toledo e cols, 2001). Já a produção de IL-10 nas mesmas condições acima se mostrou diminuída com o tratamento (Toledo e cols, 2001), inclusive em comparação com indivíduos assintomáticos moradores de áreas endêmicas para a leishmaniose (Bittar e cols, 2007). Para os indivíduos com lesões ativas em áreas endêmicas, se observa a alta produção de FNT- α , IFN- γ e IL-10 pelas

células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígenos de *Leishmania* (Castellano e cols, 2009). É possível que a dosagem basal das citocinas produzidas pelas células mononucleares purificadas do sangue dos indivíduos infectados e durante o tratamento possa refletir de forma fidedigna o estado imunológico do indivíduo naquele momento avaliado da doença e da terapia.

Em nosso estudo, a produção de peróxido de hidrogênio foi quantificada com a finalidade de avaliar a capacidade microbicida dos monócitos para a leishmânia. Os indivíduos com leishmaniose cutânea apresentaram uma produção de peróxido de hidrogênio maior do que a dos indivíduos controles normais. Estes dados estão de acordo com estudos que detectaram um aumento na concentração total de peróxido de hidrogênio e quantificaram a resposta anti-oxidativa no plasma sanguíneo de indivíduos com leishmaniose cutânea, caracterizando um perfil altamente oxidativo para esta doença (Kocyigit e cols, 2005; Ozbilge e cols, 2005). A escassez de parasitos nas lesões ulceradas dos indivíduos estudados, avaliadas pelos exames histopatológicos e pelas culturas, confirmam a eficiência da atividade microbicida dos radicais de oxigênio que foram observadas neste estudo. Entretanto, estes radicais não somente causam a destruição do parasito, como também podem levar a danos oxidativos nas células não-infectadas, portanto, estas moléculas poderiam contribuir para a imunopatogenia das lesões nas úlceras cutâneas. O tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina não foi capaz de influenciar a produção de peróxido de hidrogênio, que permaneceu alta até o fim do tratamento.

Como limitações do presente estudo primeiramente o fato de não ter sido quantificada a produção de óxido nítrico, o que complementaria as informações a respeito da atuação microbicida destes monócitos sobre o parasito. Em segundo lugar, o número pequeno de indivíduos infectados analisados, visto que não deveriam apresentar nenhuma outra infecção, complicação clínica, uso de medicamento ou alteração concomitante capaz de influenciar as funções do sistema imunitário.

Durante a infecção natural, a fagocitose é o principal mecanismo de defesa contra a leishmânia, tanto do sistema imunitário inato quanto do sistema imunitário adquirido do hospedeiro. O decréscimo desta função dos monócitos deve contribuir para o escape do parasito, e o aumento da fagocitose proporcionado pelo tratamento com o antimonial, mostrado neste trabalho, sugere que a droga poderia fornecer um mecanismo de contra-escape para o fagócito.

A produção do fator de necrose tumoral- α que se encontrava diminuída com a infecção pela leishmânia e, portanto, também favorecia a persistência do parasito, aumentou pelo tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina. O aumento da produção desta citocina pelos monócitos pode ter uma ação autócrina, estimulando sua própria produção (Vassalli, 1992), melhorando assim a eficiência da eliminação do parasito pelo reforço do perfil Ta1 de resposta.

Não houve produção de IL-10 pelos monócitos para muitos indivíduos e, após o tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina, não houve diferença entre os grupos. Entretanto, é importante considerar que a produção observada neste trabalho foi a referente aos monócitos e não significa

necessariamente que outras células não estivessem produzindo esta citocina nos indivíduos com leishmaniose.

Observamos uma maior produção de IFN- γ nos indivíduos com leishmaniose em relação aos indivíduos normais. Entretanto, embora esta diferença tenha sido estatisticamente significativa, como foi muito pequena, não se pode inferir, apenas com estes dados, que ele tenha significado biológico.

Quanto à produção de peróxido de hidrogênio, é importante ressaltar que este já se encontrava elevado mesmo antes do tratamento com o antimonial nos indivíduos com a infecção, enquanto a fagocitose e a produção de FNT- α mostraram-se diminuídas. É possível que a ligação de moléculas inibitórias, presentes no parasito, como o LPG, foram capazes de impedir a fagocitose, mas a interação parasito-hospedeiro foi suficiente para desencadear a explosão oxidativa e permitir assim, a produção deste radical. Esta alta produção de peróxido de hidrogênio não foi modificada pelo tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina. Este aumento de radicais livres associado ao fato da ausência do parasito na maioria das lesões ulceradas, observada nas culturas e exames histopatológicos, sugere que este aumento está exercendo sua função microbicida, mas poderá também estar participando da imunopatogenia das lesões cutâneas.

Como em seres humanos as respostas imunes se apresentam altamente variáveis, na dependência de fatores do parasito e do próprio indivíduo, com grande variedade genética de respostas imunes, estas respostas do sistema imune inato foram avaliadas também nos modelos murinos Balb/C e C57BL6, considerando que estes animais isogênicos teriam

uma maior homogeneidade quanto às características genéticas, que influenciam decisivamente nas respostas imunes observadas.

5.2- Estudo em camundongos

Os estudos realizados utilizando modelos experimentais têm servido como embasamento para a elucidação dos mecanismos imunológicos relacionados às leishmanioses. Ilustrando este fato, tem-se o paradigma das respostas Ta_1 e Ta_2 na infecção murina por *Leishmania major*. Nestes modelos de resistência e susceptibilidade, o camundongo BALB/c é referido como susceptível, produzindo citocinas do perfil Ta_2 , em particular, IL-4 e IL-10 em resposta à infecção, conduzindo à progressão da doença. Já o camundongo resistente (C57BL/6), recupera-se da infecção pela indução de uma resposta Ta_1 polarizada, resultando na ativação dos macrófagos e na destruição dos parasitos (Sacks e Noben-Trauth, 2002).

As infecções experimentais estudadas não se limitam aos ensaios com *L. major*, mas a infecção em modelos animais por outras espécies também é relatada, e aspectos da resposta imunológica do hospedeiro são investigados, como para *L. mexicana* (Buxbaum e Scott, 2005), *L. panamensis* (Guevara-Mendoza e cols, 1997) *L. amazonensis* (Padigel e cols, 2003), *L. donovani* (Bhowmick e Ali, 2009) e *L. braziliensis* (DeKrey e cols, 1998; Lima e cols, 1999). A infecção experimental por esta última espécie tem despertado interesse por estar relacionada com a forma mucosa da leishmaniose (de Moura e cols, 2005).

A susceptibilidade dos camundongos às variadas espécies de leishmânia tem sido estudada, e a influência de fatores genéticos do animal

vem sendo comprovada com a identificação de genes, como o *Slc11a1*. Este gene encontra-se envolvido com a resistência à *L. donovani*. A identificação de outros genes pode ajudar a esclarecer a resposta imune complexa existente contra o parasito nestes modelos (Foote e Handman, 2005).

No presente estudo, a resposta imunológica durante a infecção experimental por leishmânia e durante o tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina, a droga de escolha para o tratamento das leishmanioses cutâneas, foi avaliada por meio das funções dos macrófagos. Estas células atuam na infecção como hospedeiras do parasito quando quiescentes, mas também como as células efectoras na eliminação do parasito após a sua ativação (Herwaldt, 1999).

Os modelos experimentais selecionados para a infecção experimental foram os camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 por serem modelos caracterizados na literatura.

Foram analisados camundongos machos e fêmeas, por serem mais fidedignos da infecção natural, que não tem preferência por gênero. Tem sido sugerido que o gênero dos animais tem influência sobre a resposta imunológica resultante frente à infecção, inclusive com diferenças na resposta de acordo com a espécie de leishmânia empregada na infecção (Mock e Nacy, 1988; Roberts e cols, 2001; Travi e cols, 2002). A fim de minimizar esta influência, procurou-se distribuir camundongos machos e fêmeas de maneira equivalente nos grupos analisados neste trabalho. Utilizamos a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Shaw, 1994) por ser uma espécie de leishmânia frequente no Brasil.

Uma consideração importante a ser feita é o fato de que os camundongos BALB/c são reconhecidamente susceptíveis à *L. amazonensis*, produzindo infecções progressivas e sem cura, enquanto que os camundongos C57BL/6 desenvolvem lesões que não se curam, de gravidades variáveis (Maioli e cols, 2004).

Os macrófagos peritoneais foram analisados neste estudo por serem as principais células ativas na fagocitose das leishmânias (Maia e cols, 2007), e pelos macrófagos serem os responsáveis pela fase efetora da imunidade adquirida contra as leishmânias (Alexander e cols, 1999).

A fagocitose é a principal estratégia de defesa dos macrófagos contra as leishmânias, na qual os macrófagos interiorizam o parasito e o destroem pela produção das espécies reativas de oxigênio e pela acidificação do fagolisossoma (Cunningham, 2002).

A fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* pelos macrófagos peritoneais das duas linhagens de camundongos utilizando receptores para padrões moleculares de patógenos e receptores para opsoninas foi avaliada neste estudo. A fagocitose empregando os dois tipos de receptores e as duas concentrações de leveduras mostraram resultados diferentes entre as linhagens de camundongos. Nos experimentos com os camundongos BALB/c, a capacidade fagocitária dos grupos de camundongos infectados por *Leishmania amazonensis* se mostrou maior do que a dos grupos não infectados, tanto tratados com salina como os tratados com o antimoniato de N-metil glucamina, entretanto, a droga aumentou discretamente a capacidade fagocitária dos animais infectados. Já a capacidade fagocitária dos camundongos C57BL/6 não mostrou diferença significativa entre os grupos. A

comparação entre as duas linhagens de camundongos revelou que embora não tenha havido diferenças estatísticas entre os grupos dos camundongos C57BL/6, a capacidade fagocitária dos grupos não infectados destes camundongos já se encontrava discretamente maior em relação aos camundongos BALB/c, que só mostraram uma maior capacidade fagocitária após a infecção. É possível que esta maior competência basal dos macrófagos dos camundongos C57BL6 possa contribuir para uma evolução mais benigna da doença que a dos animais BALB/c, que embora tenham aumentado sua capacidade fagocitária após a infecção, analisada dois meses e meio após a inoculação dos protozoários, foram incapazes de evitar o agravamento das lesões, em relação aos camundongos C57BL/6. De fato, após a entrada do parasito nos macrófagos dos camundongos BALB/c, a *Leishmania amazonensis* subverte a fagocitose, provocando modificações no fagolisossomo e, com isto, consegue proliferar no interior destas células (Osorio y Fortéa e cols, 2007; Osorio y Fortéa e cols, 2009).

A produção de peróxido de hidrogênio foi determinada no presente estudo por se tratar de uma das espécies produzidas pela explosão oxidativa, processo que ocorre após a fagocitose, e que faz parte do arsenal microbicida utilizado pelos macrófagos dos animais estudados para a defesa contra a leishmânia (Gantt e cols, 2001). Na comparação da produção basal de peróxido de hidrogênio entre as duas linhagens, o grupo dos camundongos C57BL/6 que recebeu salina apresentou uma maior produção de peróxido de hidrogênio em relação ao grupo que recebeu o mesmo tratamento dos camundongos BALB/c, entretanto, observamos efeito inverso entre as duas linhagens para o grupo dos camundongos infectados e tratados com a droga.

Os grupos que foram tratados com a droga mostraram produções similares nas duas linhagens. E, o grupo infectado por leishmânia dos camundongos C57BL/6 apresentou, biologicamente, maior produção do peróxido de hidrogênio em relação ao grupo infectado dos camundongos BALB/c. Quando os macrófagos peritoneais foram estimulados, não foi possível mostrar diferenças estatísticas entre os grupos.

A produção de peróxido de hidrogênio é um dos mecanismos utilizados para a eliminação do parasito estudados em linhagens de camundongos, como na infecção experimental de camundongos BALB/c por *Leishmania chagasi* (Wilson e cols, 1994), ou por *Leishmania guyanensis* (Sousa-Franco e cols, 2006). O fato de a produção basal de peróxido de hidrogênio persistir aumentada na linhagem BALB/c, acima da observada na linhagem C57BL/6, nos animais infetados, uma semana após o tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina (Leish+Gluc), pode estar relacionado à patogenia da doença, visto que estes radicais podem estar envolvidos com a formação da lesão quando da produção exacerbada (Liew e Millott, 1990), e estes animais apresentam lesões mais graves. Deve-se ainda ressaltar que a linhagem C57BL/6 mostrou uma grande produção deste radical durante a infecção, e foi eficiente em controlar a produção deste radical sob a influência da droga. É possível que este resultado esteja relacionado ao fato destes animais apresentarem lesões mais discretas.

Ainda analisando os mecanismos microbicidas dos macrófagos em relação à leishmânia, a produção de óxido nítrico, a principal molécula considerada efetora da destruição intracelular do parasito (Holzmuller e cols, 2006), também foi determinada nas duas linhagens de camundongos. A

comparação entre as produções basal e estimulada de óxido nítrico das duas linhagens mostrou que, nas duas linhagens, houve uma maior produção de óxido nítrico pelos grupos infectados pela leishmânia. Um aspecto interessante é o fato de que metade dos animais do grupo infectado dos camundongos BALB/c apresentou uma produção basal de óxido nítrico exacerbada, o que não ocorreu com o grupo correspondente dos animais C57BL/6.

A produção basal de óxido nítrico se mostrou muito baixa para as duas linhagens, porém, os animais infectados da linhagem BALB/c apresentaram maior produção desta molécula. Estas observações foram opostas àquelas observadas na infecção pela *L. major*, onde foi detectada uma maior expressão da enzima sintase do óxido nítrico nos linfonodos da linhagem C57BL/6 em relação à linhagem BALB/c (Stenger e cols, 1994). Estes dados sugerem que a resposta do sistema imunitário pode depender não apenas da base genética do hospedeiro, mas da interação parasito-hospedeiro, que foi diferente nos dois estudos. É possível que a produção exacerbada de óxido nítrico, interagindo com a produção também exacerbada do peróxido de hidrogênio, pode estar relacionada à severidade das lesões exibidas pelos camundongos BALB/c (Liew e Millott, 1990), devido a formação de peróxido nitritos, que têm alto potencial de lesão tecidual.

A associação já extensivamente estudada de que os camundongos BALB/c são susceptíveis à leishmaniose e os camundongos C57BL/6 são resistentes quando infectados por *Leishmania major*, não pode ser totalmente considerada quando estas linhagens são infectadas pela *Leishmania amazonensis*. Os camundongos C57BL/6 infectados por esta espécie de leishmânia apresentam também um fenótipo de susceptibilidade à

leishmaniose (Jones e cols, 2000), embora em termos proporcionais, mais resistentes que os animais BALB/c (Maioli e cols, 2005).

Em conclusão, os nossos resultados da parte realizada com animais de experimentação mostraram que os perfis de resposta das funções dos macrófagos analisadas foram diferentes na comparação entre as duas linhagens. Enquanto os animais BALB/c apresentaram um nível basal de resposta mais baixo, que só aumentou após a infecção, os animais C57BL/6, embora não tivessem apresentado diferenças significantes entre as respostas dos grupos, mostraram respostas basais mais elevadas que os animais BALB/c antes da infecção, embora o aumento das funções do sistema imunitário tivessem sido maiores durante o período de infecção para os animais BALB/c. Estes dados estão de acordo com as lesões observadas nos animais, pois as lesões dos animais C57BL/6 se mostram mais discretas do que as exibidas pelos animais BALB/c (Maioli e cols, 2005).

O tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina foi capaz de estimular a fagocitose e a produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos dos animais BALB/c, embora tenha mostrado uma tendência para inibir a produção de óxido nítrico por estes macrófagos, sendo que esta é a principal molécula responsável pela destruição deste parasito. De acordo com isto, vários estudos apontam que o tratamento de camundongos BALB/c com os antimoniais é ineficiente no controle da infecção por diferentes espécies de *Leishmania* (Li e cols, 1997; Murray e cols, 2000; Yardley e Croft, 2000). Já para os nossos camundongos C57BL/6, o tratamento não ocasionou diferença estatística entre os grupos.

Traçando um paralelo entre as análises realizadas em seres humanos e nas infecções experimentais, o perfil de resposta dos fagócitos dos pacientes com leishmaniose apresenta maior semelhança com o perfil observado nos fagócitos dos camundongos BALB/c. Estes aspectos semelhantes dizem respeito ao aumento da capacidade fagocitária causado pelo tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina e a alta produção de peróxido de hidrogênio desencadeada pela infecção. Entretanto, esta observação é feita com cautela, visto que os indivíduos infectados pela leishmânia apresentam perfis genético e imunológico diferentes entre si, e não sabemos quantos indivíduos foram infectados por outras espécies de leishmânia.

Nossos dados mostram, pela primeira vez, que o antimoniato de N-metil glucamina é capaz de modificar as funções de fagócitos *in vivo*, tanto em indivíduos infectados pela *Leishmania* quanto em modelos animais infectados experimentalmente. As análises se concentraram na fagocitose, na produção de radicais de nitrogênio e oxigênio e, para os humanos, na produção das citocinas implicadas na resposta imune contra o parasito. O antimoniato de N-metil glucamina, portanto, foi capaz de interferir nas funções dos fagócitos nestes sistemas estudados, com atuações de estimulação, como no caso da fagocitose, contribuindo para as reações de defesa. Entretanto, este é apenas um dos pontos implicados na resposta imune contra este microrganismo. Este aumento da compreensão do modo de atuação desta droga sobre a resposta imune poderá implicar numa terapêutica mais adequada para as leishmanioses.

6-Conclusões

Considerando os seguintes resultados:

- 1- O tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina aumentou a capacidade fagocitária dos monócitos do sangue periférico dos indivíduos infectados por leishmânia já no sétimo dia de tratamento, sendo que esta se encontrava deprimida pela infecção. Isto ocorreu devido a um maior envolvimento dos monócitos na fagocitose.
- 2- A produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos do sangue periférico dos indivíduos infectados pela *Leishmania* já se encontrava elevada em relação aos indivíduos controles e o tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina não foi capaz de modificar esta produção, que se manteve elevada até o final do tratamento com a droga.
- 3- A produção do FNT- α pelos monócitos do sangue periférico de indivíduos infectados pela *Leishmania*, que se encontrava deprimida em relação aos controles, aumentou significativamente já no sétimo dia do tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina.
- 4- A produção de IL-10 pelos monócitos do sangue periférico dos indivíduos infectados pela *Leishmania* foi baixa, detectada em poucos indivíduos e não foram observadas diferenças entre os grupos com o tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina.
- 5- A produção de IFN- γ pelos monócitos do sangue periférico dos indivíduos infectados pela *Leishmania* apresentou um pequeno aumento em relação aos indivíduos controles, mas não se sabe se esta pequena

- diferença possui significado biológico. O tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina não influenciou na produção desta citocina, tanto no plasma sanguíneo quanto no sobrenadante das culturas dos monócitos e linfócitos do sangue periférico.
- 6- A capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados pela *Leishmania amazonensis* foi maior que a de camundongos não infectados, e o tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina aumentou discretamente a capacidade fagocitária dos animais infectados. Não houve diferença significativa da capacidade fagocitária entre os grupos de camundongos C57BL/6. Entretanto, a capacidade fagocitária dos camundongos C57BL6 normais já se encontrasse discretamente maior do que a dos camundongos BALB/c, que só mostraram maior capacidade fagocitária após a infecção com o protozoário.
- 7- Tanto o antimoniato de N-metil glucamina quanto a infecção pela *Leishmania amazonensis* aumentaram a produção basal de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c, contudo não influenciaram a produção deste radical livre pelos macrófagos dos camundongos C57BL6. Entretanto, para os grupos dos camundongos normais, a produção basal do NO pelos macrófagos daqueles da linhagem C57BL6 já era maior do que a dos camundongos da linhagem BALB/c, significando que os animais C57BL6 já se encontravam em um patamar mais elevado de resposta, antes da infecção e/ou tratamento, do que os BALB/c.

8- A infecção pela *Leishmania amazonensis* e o tratamento com o antimonial aumentaram a produção do óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c e não influenciaram os macrófagos dos camundongos C57BL6. Não houve diferença estatística na produção basal do NO entre os dois grupos. Entretanto, embora sem significância estatística, chama a atenção que no grupo infectado pelo protozoário, metade dos animais BALB/c mostraram produção muito exacerbada desta molécula, enquanto nenhum animal C57BL6 mostrou produção muito elevada desta molécula, embora, mais elevada do que o grupo não infectado.

O conjunto dos nossos dados mostrou que o antimoniato de N-metil glucamina foi capaz de modificar as funções de fagócitos de seres humanos infectados pela *Leishmania* e de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela *Leishmania amazonensis*, estimulando funções microbidas e influenciando, portanto, na resposta imune contra o parasito.

7-Referências Bibliográficas

Abbas K, Breton J, Drapier J. The interplay between nitric oxide and peroxidoxins. *Immunobiology*. 2008;213:815-22.

Afonso L, Borges VM, Cruz H, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, Dutra NA, Clarêncio J, Oliveira CI, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn CI. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukoc Biol*. 2008;84:389-96.

Ajdary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K, Khaarazmi A. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infect Immun*. 2000;68:1760-4.

Akilov OE, Kasuboski RE, Carter CR, McDowell MA. The role of mannose receptor during experimental leishmaniasis. *J Leukoc Biol*. 2007;81:1188-96.

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

Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci*. 1999;112 Pt 18:2993-3002.

Amato VS, Andrade Jr HF, Duarte MI. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop*. 2003;85:39-49.

Anderson CF, Oukka M, Kurchroo VJ, Sacks D. CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *JEM*. 2007;204:285-97.

Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *AmJ Med*. 2000;109:33-44.

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

Bailey MS, Lockwood DNJ. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol*. 2007; 25:203-11.

A citação bibliográfica no texto seguiu o sistema de Harvard e a estruturação das referências na listagem da bibliografia seguiu o estilo de Vancouver. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *BMJ* 1991; 302: 338-341. Halsey MJ. References. In: Hall GM, ed. How to write a paper. London BMJ; 1994: 49-50.

Balaña-Fouce R, Reguera RM, Cubría C, Ordóñez D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmac.* 1998;30:435-43.

Barr SD, Gedamu L. Role of peroxidoxins in *Leishmania chagasi* survival. *J Biol Chem.* 2003;278:10816-23.

Basu MK, Ray M. Macrophage and leishmania: an unacceptable coexistence. *Crit Rev Microbiol.* 2005;31;145-54.

Belkaid Y, Picirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4⁽⁺⁾ CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature.* 2002;420:502-7.

Berman J. Current treatment approaches to leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2003; 16:397-401.

Bern C, Maguire JH, Alvar J Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008; 2.

Bhowmick S, Ali N. Identification of novel *Leishmania donovani* antigens that help define correlates of vaccine-mediated protection in visceral leishmaniasis. *Plos ONE* 4.2009;(6).

Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102:625-30.

Blackwell JM, Fakiola M, Ibrahim ME, Jamieson SE, Jeronimo SB, Miller EN, Mishra A, Mohamed HS, Peacock CS, Raju M, Sundar S, Wilson ME. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. *Parasite Immunol.* 2009;31:254-66.

Bodman-Smith KB, Mbuchi M, Culley FJ, Bates PA, Raynes JG. C-reactive protein-mediated phagocytosis of *Leishmania donovani* promastigotes does not alter parasite survival or macrophage responses. *Parasite Immunol.* 2002;24;447-454.

Bogdan C, Gessner A, Rölinghoff, M. Cytokines in Leishmaniasis: a complex network of stimulatory and inhibitory interactions. *Immunobiology.* 1993; 189: 356-96.

Bogdan C, Nathan C. Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;685:713-39.

Bogdan C, Gessner A, Solbach W, Rollinghoff M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol.* 1996;8:517-25.

Bogdan C. The multiples function of nitric oxide in (auto)immunity. *J Exp Med.* 1998;187:1361-5.

Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev.* 2000;173:17-26.

Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol.* 2000;12:64-76.

Bogdan C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens:leishmaniasis as an example. *Cell Microbiol.* 2008;10:1221-34.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon- γ . *Annu Rev Immunol.* 1997;15:749-95.

Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Neto MB, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic responses in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 1996;84:188-94.

Bottrel RLA, Dutra WO, Martins FA, Gontijo B, Carvalho E, Barral-Netto M, Barral A, Almeida RP, Mayrink W, Lockskley R, Gollob KJ. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 2001;69;3232-9.

Brittingham A, Chen G, McGwire B, Chang K, Mosser DM. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infect Immun.* 1999;67;4477-84.

Buxbaum LU. A detrimental role for IgG and Fc γ R in *Leishmania mexicana* infection. *Immunol Res.* 2008;42;197-209.

Buxbaum LU, Scott P. Interleukin 10- and Fc γ receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. *Infect Immun.* 2005;73:2101-8.

Cáceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sánchez MA, Yamamura M, Uyemura K, Modlin RL, Bloom BR, Convit J. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol.* 1993;91:500-505.

Carvalho DG, Barbosa A Jr, D'El-Rei Hermida M, Clarencio J, Pinheiro NF Jr, Veras PS, dos-Santos WL. The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion in vitro: application to disclose a specific inhibitory effect of *Leishmania* infection. *Exp Parasitol.* 2004;107:189-99.

Carvalho LP, Passos S, Bacellar O, Lessa M, Almeida RP, Magalhães A, Dutra WO, Gollob KJ, Machado P, de Jesus AR. Differential immune regulation

of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol.* 2007;29:251-8.

Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessenin, H, Prata A, Dessenin A, Rodrigues V. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. *Humam Immunol.* 2009;70:383-90.

Cervia JS, Rosen H, Murray HW. Effector role of blood monocytes in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 1993;61:1330-3.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:111-26.

Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol.* 2002;72:132-41.

Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, Azeredo-Coutinho RB, Coutinho SG. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9:251-6.

Das M, Mukherjee SB, Shaha C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Cell Sci.* 2001; 114:2461-9.

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

de Moura FJ, Leal PP, de Souza Furtado R, Muniz-Junqueira MI, Veiga JP. Pentoxifylline prevents the meglumine antimonate-induced renal toxicity in rats, but not that induced by the inorganic antimony pentachloride. *Toxicology.* 2008;243:66-74.

De Trez C, Magez S, Akira S, Ryffel B, Carlier Y, Muraille E. iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania major* infection phase of C57BL/6 resistant mice. *PLOS Pathogen.* 2009 ; 5.

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

Denkers EY, Butcher BA. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends Parasitol.* 2005;21:35-41.

Derouich-Guergour D, Brenier-Pinchart MP, Ambroise-Thomas P, Pelloux H. Tumour necrosis factor α receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections. *Int J Parasitol.* 2001;31:763-9.

Descoteaux A, Turco SJ. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta*. 1999;341-52.

Erel O, Kocyigit A, Bulut V, Gurel MS. Reactive nitrogen and oxygen intermediates in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998; 94:179-83.

Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2:820-32.

Farber JL. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environ Health Perspect*. 1994;102:17-24.

Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis*. 2002;34:54-8.

Foot S, Handman E. Genetics of murine leishmaniasis. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2005;4:270-6.

Fortier A, Min-Oo G, Forbes J, Lam-Yuk-Tseung S, Gros P. Single gene effects in mouse models of host: pathogen interactions. *J Leukoc Biol*. 2005; 77:868-77.

Frézard F, Martins PS, Bahia APCO, Le Moyec L, de Melo AL, Pimenta AMC, Salerno M, da Silva JBB, Demicheli C. Enhanced oral delivery of antimony from meglumine antimoniate/ β -cyclodextrin nanoassemblies. *Int J Pharm*. 2008a;347:102-8.

Frézard F, Martins PS, Barbosa MCM, Pimenta AMC, Ferreira WA, de Melo JE, Mangrum JB, Demicheli C. New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonate and sodium stibogluconate. *J Inorg Biochem*. 2008b;102:656-65.

Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*. 2009;14:2317-36.

Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jeronimo SMB, Nascimento ET, Britigan BE, Wilson ME. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J. Immunol*. 2001;167:893-901.

Gomes IN, Palma LC, Campos GO, Lima JG, DE Almeida TF, DE Menezes JP, Ferreira CA, Santos RR, Buck GA, Manque PA, Ozaque LS, Probst CM, DE Freitas LA, Krieger MA, Veras PS. The scavenger receptor MARCO is involved in *Leishmania major* infection by CBA/J macrophages. *Parasite Immunol*. 2009;31:188-98.

Gregory DJ, Olivier M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology*. 2005;S27-S35.

Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft S, Desjeux P, Wasunna MK, Bryceson ADM. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis.* 2002;2:494-501.

Guevara-Mendoza O, Une C, Franceschi Carreira P, Orn A. Experimental infection of Balb/c mice with *Leishmania panamensis* and *Leishmania mexicana*: induction of early IFN-gamma but not IL-4 is associated with the development of cutaneous lesions. *Scand J Immunol.* 1997;46:35-40.

Haas N, Hauptmann S, Paralikoudi D, Muche M, Kolde. Interferon- γ treatment induces granulomatous tissue reaction in a case of localized cutaneous leishmaniasis. *Am J Dermatopathol.* 2002;24:319-23.

Handman E, Bullen DV. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* 2002;18:332-4.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999;354:1191-9

Holzmueller P, Hide M, Sereno D, Lemesre J. *Leishmania infantum* amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: impact on in vitro parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities. *Infect Genet Evol.* 2006; 6:187-97.

Hotez PJ, Botazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago, MR. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008; 2.

John B, Hunter CA. Neutrophil soldiers or trojan horses? *Science.* 2008;321:917-8.

Jones DE, Buxbaum LU, Scott P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol.* 2000;165:364-72.

Kavoosi G, Ardestani SK, Kariminia A, Zeinali M, Alimohammadian MH. *Leishmania major*: effects of proteophosphoglycan on reactive oxygen species, IL-12, IFN- γ and IL-10 production in healthy individuals. *Exp Parasitol.* 2008;120:62-6.

Kemp K, Theander G, Hviid L, Garfar A, Kharazmi A, Kemp M. Interferon- γ - and tumor necrosis factor- α -producing cells in humans who are immune to cutaneous leishmaniasis. *Scand J Immunol.* 1999;49:655-9.

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

Klebanoff SJ. Oxygen metabolites from phagocytes. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, editores. *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. Second edition. New York: Raven Press Ltd; 1992 p.541-588.

Kolde G, Luger T, Sorg C, Sunderkotter C. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis using systemic interferon-gamma. *Dermatology.* 1996;192:56-60.

Kocyigit A, Gur S, Gurel MS, Bulut V, Ulukanligil M. Antimonial therapy induces circulating proinflammatory cytokines in patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 2002;70:6589-6591.

Kocyigit A, Keles H, Selek S, Guzel S, Celik H, Erel O. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutat Res.* 2005;585:71-8.

Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, 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;72:1920-8.

Laufs H, Müller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, Solbach W, Laskay T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun.* 2002;70:826-35.

Li J, Sutterwala S, Farrell JP. Successful therapy of chronic, nonhealing murine cutaneous leishmaniasis with sodium stibogluconate and gamma interferon depends on continued interleukin-12 production. *Infect Immun.* 1997;65:3225-30.

Liese J, Schleicher U, Bogdan C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology.* 2008; 213: 377-87.

Liew FY, Millott S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol.* 1990;145:4306-10.

Lima HC, DeKrey GK, Titus RG. Resolution of an infection with *Leishmania braziliensis* confers complete protection to a subsequent challenge with *Leishmania major* in BALB/c mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94:71-6.

Lodge R, Descoteaux A. Modulation of phagolysosome biogenesis by lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clin Immunol.* 2005;114:256-65.

Lodge R, Diallo TO, Descoteaux A. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell Microbiol.* 2006;8:1922-31.

Love DC, Mentink Kane M, Mosser DM. *Leishmania amazonensis*: the phagocytosis of amastigotes by macrophages. *Exp Parasitol.* 1998;88:161-71.

MacMicking J, Xie Q, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:323-50.

Maia C, Rolão N, Nunes M, Gonçalves L, Campino L. Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. *Acta Trop.* 2007;103:150-5.

Maioli TU, Takane E, Arantes RM, Fietto JL, Afonso LC. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. *Parasitol Res.* 2004;94:207-12.

Manna L, Reale S, Picillo E, Vitale F, Gravino AE. Interferon-gamma (INF-gamma), IL4 expression levels and *Leishmania* DNA load as prognostic markers for monitoring response to treatment of leishmaniotic dogs with miltefosine and allopurinol. *Cytokine.* 2008;44:288-92.

Mansueto P, Vitale G, Di Lorenzo G, Rini GB, Mansueto S, Cillari E. Immunopathology of leishmaniasis: an update. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2007;20:435-45.

Markle WH, Makhoul K. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. *Am Fam Physician.* 2004;69:1455-60.

Marsden PD. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1985; 18:187-98.

Maurer M, Kostka SL, Siebenhaar F, Moelle K, Metz M, Knop J, von Stebut E. Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. *FASEB J* 2006 doi:10.1096/fj.06-5860com.

McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol Rev.* 2004;201:206-24.

Minodier P, Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Infect Dis.* 2007;5:150-8.

Mock BA, Nacy CA. Hormonal modulation of sex differences in resistance to *Leishmania major* systemic infections. *Infect Immun.* 1988;56:3316-9

Moore KW, O'Garra A, Malefyt R W, Vieira P, Mossmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:165-90.

Mossalayi MD, Arock M, Mazier D, Vincendau P, Vouldoukis I. The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. *Parasitol Today*. 1999;15:342-5.

Mosser DM, Rosenthal, LA. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin Cell Biol*. 1993;4:315-22.

Muniz-Junqueira MI, dos Santos-Neto LL, Tosta CE. Influence of tumor necrosis factor-alpha on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* in vitro. *Cell Immunol*. 2001;208:73-9.

Muniz-Junqueira MI, Peçanha LM, da Silva-Filho VL, de Almeida Cardoso MC, Tosta CE. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:1096-102.

Muniz-Junqueira MI, de Paula-Coelho VN. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF- α production, but only via TNF- α it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, *in vitro*. *Int Immunopharmacol*. 2008;8:1633-8.

Murray HW. Mononuclear cell recruitment, granuloma assembly, and response to treatment in experimental visceral leishmaniasis: intracellular adhesion molecule 1-dependent and -independent regulation. *Infect Immun*. 2000;68:6294-9.

Naderer T, McConville MJ. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolica perspective. *Cell Microbiol*. 2008;10; 301-8.

Narayan S, Bimal S, Singh SK, Gupta AK, Sinha PK, Das P. *Leishmania donovani* vs immunity: T-cells sensitized from *Leishmania* of one donor may modulate their cytokines pattern on re-stimulation with *Leishmania* from different donor in visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2009;121:69-75.

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

Osorio y Fortéa J, Prina E, de La Llave E, Lecoœur H, Lang T, Milon G. Unveiling pathways used by *Leishmania amazonensis* amastigotes to subvert macrophage function. *Immunol Rev*. 2007;219:66-74.

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

Ouellete M, Drummelsmith J, Papadopoulou. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. Drug Resit Updat. 2004;7:257-66.

Ozbilge H, Aksoy N, Kilic E et al. Evaluation of oxidative stress in cutaneous leishmaniasis. J Dermatol. 2005;32:7-11.

Padigel UM, Alexander J, Farrell JP. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. J Immunol. 2003;171:3705-10.

Paula CDR, Sampaio JHD, Cardoso DR, Sampaio RNR. Estudo comparativo da eficacia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil glucamina 20mgSbV /kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutanea da leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36 : 365-71.

Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. Curr Opin Immunol.2002;14:123-8.

Pick E, Mizel D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. J Immunol Methods. 1981;46:211-26.

Pinheiro NF Jr, Hermida MD, Macedo MP, Mengel J, Bafica A, dos-Santos WL. *Leishmania* infection impairs beta 1-integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. Infect Immun. 2006;74:3912-21.

Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. J Clin Invest. 1993;91:1390-5.

Piscoppo TV, Azzopardi CM. Leishmaniasis. Postgrad. Med. J. 2006.

Plewes KA, Barr SD, Gedamu L. Iron superoxide dismutases targeted to the glycosomes of *Leishmania chagasi* are important for survival. Infect Immun. 2003; 71:5910-20.

Raveth J, Aderem A. Phagocytic cells. Immunol Rev. 2007:219;5-7.

Reis LC, Brito MEF, Souza MA, Medeiros ACR, Silva CJ, Luna CF, Pereira VRA. Cellular immune responses profile in patients with american tegumentary leishmaniasis prior and post chemotherapy treatment. *J Clin Lab Anal.* 2009;23:63-9.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7:581-96.

Ribeiro, RR, Moura EP, Pimentel VM, Sampaio WM, Silva SM, Schettini DA, Alves CF, Melo FA, Tafuri WL, Demicheli C, Melo MN, Frézard F, Michalick MS. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:2564-72.

Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31:143-8.

Rittig MG, Schröppel K, Seack KH, Sander U, N'Diaye EN, Maridonneau-Parini I, Solbach W, Bogdan C. Coiling phagocytosis of trypanosomatids and fungal cells. *Infect Immun.* 1998;66:4331-9.

Roberts CW, Walker W, Alexander J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:476-88.

Roberts WL, McMurray WJ, Rainey PM. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonite (glucantime). *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:1076-82.

Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O, Ribeiro-de-Jesus, A, Filho DC, Filho AC. Down-regulation of Th1 type of response in early human american cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1999;180:1731-4.

Rogers KA, DeKrey, GK, Mbow ML, Gillespie RD, Brodskyn CI, Titus RG. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;209:1-7.

Romao S, Castro H, Sousa, Carvalho S, Tomás AM. The cytosolic trypanothione of *Leishmania infantum* is essential for parasite survival. *Int J Parasitol.* 2009;39:703-11.

Romero GAS, Guerra MVF, Paes MG, Macedo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil:therapeutic response to meglumine antimonate. Am J Trop Med Hyg. 2001; 65:456-65.

Romero GAS, Guerra MVF, Paes MG, Macedo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil:clinical findings and diagnostic approach. Clin Infect Dis. 2001; 32:1034-12.

Ruiz JH, Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunol.2007;29;671-8.

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

Santos ASL, Branquinha MH, D'Avila-Levy CM. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in search for a function. An Acad Bras Cienc. 2006;78;687-714.

Santos DO, Coutinho CER, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, Bernardino A, Bourguignon SC, Corte-Real S, Pinho RT, Rodrigues CR, Castro HC. Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review. Parasitol Res. 2008.103:1-10.

Schuster FL, Sullivan JJ. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. Clin Microbiol Rev. 2002;15:374-89.

Shaw JJ, Ishikawa EA, Lainson R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. Trans R Soc Trop Med Hyg 1989; 83:783-4.

Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994; 89:471-8.

Silveira FT, Lainson R, Gomes CMC, Laurenti MD, Corbett CEP. Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008;102:1075-80.

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

Sousa-Franco J, Araújo-Mendes E, Silva-Jardim I, Santos JL, Faria DR, Dutra WO. Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis: possible involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect.* 2006;8:390-400.

Stenger S, Thüring H, Röllinghoff M, Bogdan C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med.* 1994;180:783-93.

Tavares W. Drogas antiprotozoárias. In: Tavares W, editor. *Antibióticos e quimioterápicos para o clínico*. São Paulo: Atheneu; 2007. p. 381-405.

Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Barral-Netto M, Barral A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2006;22:32-40.

Titus RG, Bishop JV, Mejia JS. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol.* 2006;28:131-41.

Toledo VPCP, Mayrink W, Gollob KJ, Oliveira MAP, da Costa CA, Genaro O, Pinto JÁ, Afonso LC. Immunochemotherapy in american cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96:89-98.

Tovar J, Cunningham ML, Smith AC, Croft SL, Fairlamb AH. Down regulation of *Leishmania donovani* trypanothione reductase by heterologous expression of a trans-dominant mutant homologue: effect on parasite intracellular survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 5311-16.

Travi BL, Osorio Y, Melby PC, Chandrasekar B, Arteaga L, Saravia NG. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. *Infect Immun.* 2002 May;70:2288-96.

Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med.* 2007; 2:239-43.

Tripathi P, Singh V, Naik S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol.* (2007a);51:229-42.

Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol Med Microbiol.* (2007b);51:443-452.

Tuon FF, Amato VS, Bacha HA, AIMusawi T, Duarte MI, Neto VA. Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infect Immun.* 2008;76:866-72.

Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Ann Rev Immunol* 2002; 20: 825-52.

Vassali P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:411-52.

Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 2004; 90:31-7.

Von Stebut E, Udey MC. Requirements for TH1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes Infect.* 2004;6:1102-9.

Von Stebut E. Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. *Exp Dermatol.* 2007(a);16:340-6.

Von Stebut E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol.* 2007(b);17:115-22.

Wilhelm P, Ritter U, Labbow S, Donhauser N, Röllinghoff M, Bogdan C, Körner H. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *J Immunol.* 2001;166:4012-9.

WHO - World Health Organization. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/disease epidemiology/en/print.html](http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/print.html)>. Acesso em 21 jun. 2009.

Wilson ME, Pearson RD. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 1988;56:363-9.

Wilson ME, Andersen KA, Britigan BE. Response of *Leishmania chagasi* promastigotes to oxidant stress. *Infect Immun.* 1994;62:5133-41.

Winberg ME, Holm A, Särndahl E, Vinet AF, Descoteaux A, Magnusson KE, Rasmusson B, Lerm M. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan inhibits phagosomal maturation via action on membrane rafts. *Microbes Infect.* 2009;11:215-22.

Yardley V, Croft SL. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;13:243-8.

Yardley V, Ortuño N, Llaños-Cuentas A, Chappuis F, De Doncker S, Ramirez L et al. American tegumentary leishmaniasis: is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? *J Infect Dis.* 2006;194:1168-75.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, FACULDADE DE MEDICINA
ÁREA DE PATOLOGIA, LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA CELULAR**

PROJETO DE PESQUISA

Influência do N-metil glucamina sobre a função dos fagócitos, produção de citocinas e via de ativação do NFκB e imunoproteasoma na leishmaniose

RESPONSÁVEIS

Profa Dra Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira,
Profa Dra Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio
Rosana Regina de Saldanha, Marianna Carminatti

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,, anos, abaixo assinado, declaro ter lido ou ouvido o presente documento, e compreendido o seu significado, que informa o seguinte:

1. Estou participando de minha livre vontade, de uma pesquisa que usa células do meu sangue para estudar como elas estão funcionando depois que eu recebi o tratamento com o glucantime, que é o remédio que eu uso para tratar a minha doença.
2. Concordo que seja retirado 20 ml de sangue de uma veia de meu braço, por três vezes, utilizando material estéril e descartável, para obtenção das células que serão estudadas.
3. Posteriormente, se eu desejar, poderei ser informado(a) sobre o resultado do exame que será feito no meu sangue.
4. Fui esclarecido (a) que o meu nome não será divulgado.
4. Fui esclarecido que se eu não quiser participar deste projeto o tratamento que estou recebendo não mudará em nada.

Brasília, de de

nome

assinatura

.....
Voluntário

.....
Pesquisador

.....
Testemunha

com cópia para o Voluntário



Universidade de Brasília – Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-FM/UnB
Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-900 – Brasília, DF
Telefone: (61) 307-2520

Processo n.º
Fls. n.º
Rubrica

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do projeto: **CEP-FM 049/2004**

Título: **“Influência do n-metil glucamina sobre a função dos fagócitos, produção de citocinas e via de ativação do NFkB e imunoproteasoma na leishmaniose”**

Pesquisador responsável: **Maria Imaculada Muniz Junqueira Barbosa**

Documentos analisados: **Folha de rosto, carta de encaminhamento, projeto de pesquisa, bibliografia pertinente, termo de consentimento.**

Data de entrada: **16/09/2004**

Proposição do(a) Relator(a):

- Aprovação**
 Aprovação com pendências
 Não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB: **07/10/2004**

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB: **05/11/2004**

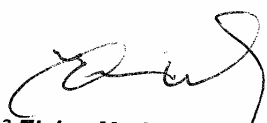
PARECER

Com base na Resolução CNS/MS n.º 196/96, que regulamenta a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, a Coordenação do CEP-FM decidiu **APROVAR “ad referendum”**, de acordo com o parecer do(a) Relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

Observação:

- 1 - Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves.
- 2 - O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília-DF, 05 de novembro de 2004.


Dr.^a Elaine Maria de Oliveira Alves
Coordenadora do CEP-FM/UnB



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL

Brasília, 29 de fevereiro de 2008.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA E DO GLUCANTIME NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA, NAS VIAS DE ATIVAÇÃO NFKB E DA CICATRIZAÇÃO DA ÚLCERA LEISHMANIÓTICA NO CAMUNDONGO", UNBDOC nº 8121/2007, sob responsabilidade da Profa. Maria Imaculada Muniz B. Junqueira, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.


Profa. Anaprella Lorenzetti Bocca
Coordenadora do CEUA