



**Universidade Federal de Sergipe  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa  
Mestrado em Biologia Parasitária**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE  
ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO PARA *Leishmania*  
*Leishmania chagasi***

**Sueli Silva de Carvalho**

**São Cristóvão  
2013**

**Sueli Silva de Carvalho**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE  
ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO PARA *Leishmania*  
*Leishmania chagasi***

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Biologia Parasitária da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do título de mestre.

**Orientador:** Dr. Paulo de Tarso Gonçalves Leopoldo

SÃO CRISTÓVÃO  
SERGIPE – BRASIL  
2013

**Sueli Silva de Carvalho**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE  
ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO PARA *Leishmania*  
*Leishmania chagasi***

**APROVADA EM: 12 /06/2013**

---

Prof. Dr. Paulo de Tarso Gonçalves Leopoldo – UFS  
(Orientador)

**EXAMINADORES**

Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida – UFS  
(Examinador)

Profa. Dra. Shirlei Octacílio da Silva – UFS  
(Examinador)

SÃO CRISTÓVÃO  
SERGIPE – BRASIL

**Ficha catalográfica elaborada pela biblioteca central  
Universidade Federal de Sergipe**

C331a Carvalho, Sueli Silva de  
Avaliação da atividade leishmanicida de espécies reativas do oxigênio para *Leishmania Leishmania* chagasi / Sueli Silva de Carvalho ; orientador Paulo de Tarso Gonçalves Leopoldo. – São Cristóvão, 2013.  
61 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Universidade Federal de Sergipe, 2013.

1. *Leishmania* (L.) chagasi. 2. Menadiona. 3. Espécies reativas do oxigênio. 4. Macrófagos J774.16. I. Leopoldo, Paulo de Tarso Gonçalves, orient. II. Título.

CDU: 576.89:616.993.161



**Ata da Sessão de Defesa da 6ª Dissertação do  
Curso de Mestrado em Biologia Parasitária/2013**

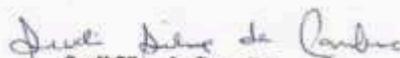
Ao décimo segundo dia de junho de dois mil e treze, com início às nove horas realizou-se no auditório da Pós-Graduação do curso em Ciências da Saúde, Aracaju-Sergipe, a sessão pública de defesa de dissertação de Mestrado em Biologia Parasitária de Sueli Silva de Carvalho, sob o título "Avaliação da atividade Leishmanicida de espécies reativas do oxigênio para *Leishmania (L.) Chagasi*", orientado pelo Prof. Dr. Paulo de Tarso Gonçalves Leopoldo (PROBP/ UFS). Aberta a sessão, o Prof. Dr. Paulo de Tarso Gonçalves Leopoldo, Presidente da Banca Examinadora, passou à palavra à candidata para a apresentação pública de seu trabalho. Em seguida, o Presidente passou a palavra à primeira examinadora, a Profª. Drª. Shirlei Octacilio da Silva (UFS/DMO), para arguição da candidata, que teve igual período para sua defesa. O mesmo aconteceu com o segundo examinador, o Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida (PROBP/UFS). Ao término da arguição dos examinadores, o Prof. Dr. Paulo de Tarso Gonçalves Leopoldo agradeceu os comentários e sugestões dos membros da banca. Encerrados os trabalhos, a banca examinadora deliberou sobre a aprovação da candidata. A banca concedeu o parecer APROVADA à candidata, sendo atendidas as exigências da Instrução Normativa 05/2011/PROBP, da Resolução nº 05/2009/CONEP que regulamenta a apresentação e defesa da Dissertação de Mestrado. Nada mais havendo a tratar, o Coordenador lavrou a presente ata que será assinada pelos examinadores e pela candidata.

Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos, 12 de junho de 2013.

  
Prof. Dr. Paulo de Tarso Gonçalves Leopoldo  
Presidente

  
Prof. Dr. Shirlei Octacilio da Silva  
Examinadora

  
Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida  
Examinador

  
Sueli Silva de Carvalho  
Mestranda

# DEDICATÓRIA

Aos meus pais João e Dileusa,  
Pela dedicação e pelo esforço que fizeram para me educar.  
E pela memória inesquecível de Erinaldo Lessa.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo amor, presença suprema e por ter colocado tantas oportunidades especiais em minha vida.

Aos meus pais João e Dileusa e meus irmãos pelo carinho, apoio e compreensão. Amo vocês.

A prima Rogesla, pelo afeto, acolhimento, alegria e solicitude incansável de ajudar as pessoas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo de Tarso Gonçalves Leopoldo, pela dedicação na realização desse trabalho, pelas correções e contribuição para meu crescimento científico.

Ao Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida, coordenador do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Universitário da UFS, pelas sugestões apresentadas em todas as etapas da pesquisa realizada;

Às Professoras Dra. Amélia Ribeiro de Jesus, Dra. Tatiana Rodrigues de Moura e Dra. Patrícia Marques pelas valiosas sugestões apresentadas em todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho, mormente na minha defesa de qualificação;

Ao Prof. Dr. Carlos Taborda Pellechi, do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo, pela gentileza de ceder as células J774.16 para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do HU/UFS Priscila Lima, Juciene Braz, Micheli Luiz, Fabrícia Alvísi, Luana Celina, Aline Barreto, Mônica Rueda, Ricardo Vieira, Marise Simon e Cecília Vazquéz, pelo carinho e amizade, proporcionando um ambiente agradável e cooperativo de trabalho no laboratório.

Aos graduandos Murilo Buenos, Jéssica Almeida, Kaeline e Talita Rebeca, por acompanhá-los na iniciação científica, pela amizade e envolvimento na realização deste trabalho.

À Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC) pelo suporte financeiro.

## RESUMO

CARVALHO, Sueli Silva de. **Avaliação da atividade leishmanicida de espécies reativas do oxigênio para *Leishmania Leishmania chagasi***. Sergipe: UFS, 2013. (Dissertação - Mestrado em Biologia Parasitária).

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por parasitos do gênero *Leishmania*. *Leishmania* são protozoários digenéticos, alternando entre as formas promastigota (flebotomíneo) e amastigota (hospedeiro mamífero). A fagocitose de promastigotas desencadeia em macrófagos um “burst oxidativo”, gerando espécies reativas do oxigênio (ROS) como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e o radical hidroxila (OH). Assim, objetivamos avaliar in vitro a atividade leishmanicida de ROS para promastigotas de *L.(L.) chagasi*, bem como para suas respectivas formas amastigotas. Para a avaliação da toxicidade de ROS para promastigotas, selecionamos 16 isolados de *L.(L.) chagasi* (em fase log de crescimento), incubando-os sob concentrações crescentes de menadiona (0-750 $\mu$ M) por um período de 4h, ao fim do qual determinamos a viabilidade desses parasitos, quantificando o número de formas móveis. Na avaliação da ação leishmanicida de ROS para as formas amastigotas de *L. L. chagasi*, infectamos uma linhagem celular de macrófagos murinos J774.16 com um isolado resistente e dois isolados susceptíveis a ROS (na proporção 5:1 parasitos/células) em culturas com LMNA, inibidor de iNOS, (para bloquear a síntese de óxido nítrico), incubadas com o inibidor da enzima SOD-1, dietilditiocarbamato, DETC (para aumentar a produção de  $O_2^-$ ) e com N-acetilcisteína, NAC (um antioxidante) em placas de 8 poços e incubadas por 4, 24, 48 e 72 horas. Ao término de cada incubação, coramos as placas com panótipo, para determinação do número de amastigotas (carga parasitária). A partir da exposição de promastigotas a concentrações crescentes de menadiona, observamos que dos 16 isolados avaliados, 14 deles apresentaram perdas de 50% ou mais de suas viabilidades entre concentrações de 15 a 750  $\mu$ M de menadiona (formas susceptíveis a ROS), enquanto apenas dois deles apresentaram 70% ou mais de viabilidade a 750  $\mu$ M de menadiona (formas resistentes a ROS). Na avaliação da toxicidade de ROS para as formas amastigotas, observamos nas culturas de células J774.16 infectadas por *L. L. chagasi* susceptíveis e resistente a ROS diminuição na carga parasitária de ambos os isolados a partir do período de 48 horas. Para as culturas incubadas com DETC, observamos a redução dos números de amastigotas para essas culturas, a partir do tempo de 24 horas de infecção. A adição de NAC a essas culturas reverteu a carga parasitária das culturas infectadas pelo isolado resistente, mas não as que foram infectadas pelos isolados susceptíveis a ROS, indicando que o dano induzido por DETC sobre essas amastigotas é oxidativo. Assim, é possível afirmar que as espécies reativas do oxigênio são importantes agentes tóxicos para promastigotas e amastigotas de *L. L. chagasi*.

Palavras-chaves: *L.(L.) chagasi*, menadiona, espécies reativas do oxigênio, macrófagos J774.16.

Orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Gonçalves Leopoldo – UFS

## ABSTRACT

CARVALHO, Sueli Silva. **Assessment of viability of Leishmania Leishmania chagasi to reactive oxygen species.** Sergipe: UFS, 2013. (Dissertação - Mestrado em Biologia Parasitária).

Leishmaniasis are infectious diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*, that are digenetic parasites alternating between an extracellular promastigote stage (in sand fly vector) and an intracellular amastigote stage (in mammalian host). Promastigote phagocytosis results in a macrophage respiratory burst in vitro, leading to the generation of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), singlete oxygen ( $^1O_2$ ) and hydroxyl radical (OH). Thus, we aimed to evaluate in vitro ROS toxicity for *L. L. chagasi* promastigotes, as well as for their amastigote counterparts. To evaluate ROS toxicity for promastigotes, we selected 16 *L. L. chagasi* isolates (in log phase growth) and incubated them under increasing concentrations of menadione (0-750 $\mu$ M) for 4 hours, after which we determined ROS viability for these parasites by quantifying the number of mobile forms. For ROS toxicity for amastigote *L. L. chagasi*, we infected J774.16, a murine macrophage cell line, with ROS susceptible and resistant *L. L. chagasi* (in stationary phase of growth) in cultures treated by LMNA, an iNOS inhibitor (to block the synthesis of nitric oxide), treatment with diethyldithiocarbamate (DETC), a SOD-1 inhibitor (to increase superoxide anion synthesis) as well as incubation with N-acetylcysteine, NAC ( an antioxidant). These infection experiments were conducted in 8 well plates in a 5:1 ratio (parasites/cell). Subsequently, we incubated these plates for 4, 24, 48 and 72 hours at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After that, the plates were stained and the number of amastigotes (parasite burden) determined. We observed that 14 out 16 isolates treated with menadione showed 50% or more loss of their viability at concentrations varying from 15 to 750  $\mu$ M, whereas two of them exhibited even 70% or more viability at 750 mM. From ROS toxicity evaluation for *L. L. chagasi* amastigotes, we observed in J774.16 cultures infected by ROS susceptible and resistant *L. L. chagasi* a decrease in parasitic load for both isolates. This decrease in parasite burden was observed also in cultures treated by LMNA, an iNOS inhibitor. Inhibition of SOD by DETC also promoted a decrease in the number of amastigotes for both of these J774.16 cultures from 24 hour infection. The addition of NAC to these cultures increased the number of amastigotes for ROS resistant infected J774.16 cells but nor for those ROS susceptible infected cultures. These data indicate that damage on these amastigotes induced by DETC is oxidative. Thus, it is possible to conclude that reactive oxygen species are crucial toxic agents for *L. L. chagasi* as in promastigote form, as well as in amastigote form.

Keywords: *L.(L.) chagasi*, menadione, reactive oxygen species, macrophages J774.16

Orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Gonçalves Leopoldo – UFS

## LISTA DE ABREVIATURAS

**DETC** Dietilditiocarbamato

**HBSS:** Solução salina balanceada de Hanks

**IFN $\gamma$**  Interferon-gama

**iNOS** Óxido nítrico sintase induzida

**IL** Interleucina

**LV** Leishmaniose visceral

**L VHSE** Leishmania visceral humana de Sergipe

**LPS** Lipopolissacarídeo

**LPG** Lipofosfoglicano

**NAC** N-acetilcisteína

**NO** Óxido nítrico

**LNMA** N<sup>G</sup>-metil-L-arginina

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** Ânion superóxido

**ROS** Espécies reativas do oxigênio

**ERN** Espécies reativas do nitrogênio

**PMA** Acetato miristato de forbol

**PSA** Antígeno da superfície do parasita

**PPG** proteofosfoglicano

**R** *L.(L.) chagasi* resistente a ROS

**S** *L.(L.) chagasi* susceptível a ROS

**SFB** Soro fetal bovino

**SFM** sistema fagocítico mononuclear

**SOD** Superóxido dismutase

**SOD-1** Superóxido dismutase-1

**Th1** Linfócitos T auxiliares do tipo 1

**Th2** Linfócitos T auxiliares do tipo 2

**TNF** Fator de necrose tumoral

**TLRs** Receptores Toll-Like

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa geográfico das áreas endêmicas da leishmaniose visceral.....	5
Figura 2: Ciclo Biológico da Leishmania .....	6
Figura 3: Complexo NADPH oxidase .....	12
Figura 4: Estruturas das vitamina K .....	14
Figura 5: Ciclo redox da menadiona e produção de ERO .....	15
Figura 6: Curva do percentual de viabilidade dos isolados <i>L. (L.) chagasi</i> expostos a concentrações crescentes de menadiona (0-750µM) .....	22
Figura 7: Infecção de macrófagos murinos J774.16 por <i>L.(L.) chagasi</i> susceptíveis e resistente a ROS incubado com LNMA .....	25
Figura 8: Infecção de macrófagos murinos J774.16 por <i>L.(L.) chagasi</i> susceptíveis e resistente a ROS incubados com DETC ou DETC/NAC. ....	19
Figura 9: Quantificação de ânion superóxido produzido por macrófagos murinos J774.16 durante infecção de <i>L. (L.) chagasi</i> susceptível e resistente a ROS incubados com LNMA ,DETC, DETC/NAC .....	31
Figura 10: Quantificação de óxido nítrico produzido por macrófagos murinos J774.16 durante infecção de <i>L. (L.) chagasi</i> susceptível e resistente a ROS durante incubação com LNMA ,DETC, DETC/NAC .....	33

## LISTA DE TABELA

Tabela 01: Percentual de viabilidade dos isolados de <i>L.(L.) chagasi</i> que apresentaram resistência e susceptibilidade à menadiona.....	21
---	----

# SUMÁRIO

RESUMO .....	I
ABSTRAT.....	II
LISTA DE ABREVIATURA .....	III
LISTA DE FIGURA.....	IV
LISTA DE TABELA .....	V
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 Leishmaniose Visceral .....	3
2.2 <i>Leishmania chagasi</i> é o agente etiológica da leishmaniose visceral nas Américas .....	4
2.3 Ciclo Biológico da <i>Leishmania sp.</i> .....	5
2.4 Reconhecimento da <i>Leishmania sp</i> por macrófagos e ativação de respostas oxidativas.....	6
2.5 Aspecto Imunológicos na Leishmaniose Visceral (LV).....	8
2.6 Espécies reativas de oxigênio e sua atividade leishmanicida .....	10
2.7 Menadiona e o ciclo redox .....	13
3 OBJETIVOS .....	16
3.1 Objetivo Geral .....	16
3.2 Objetivos Específicos .....	16
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Parasitos .....	17
4.2 Cultura de <i>L. (L.) chagasi</i> .....	17
4.3 Curva de crescimento de <i>L. (L.) chagasi</i> .....	17
4.4 Cultivo da linhagem de macrófagos murinos J774.16.....	17
4.5 Avaliação da viabilidade <i>in vitro</i> de promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> a ROS expostas a concentrações crescentes de menadiona .....	18
4.6 Avaliação da viabilidade a das formas amastigotas dos isolados de <i>L. (L.) chagasi</i> ROS produzidas por macrófagos murinos J774.16.. .....	18
4.7 Quantificação de Superóxido .....	19
4.8 Dosagem de óxido nítrico.....	20
4.9 Análise Estatística .....	20
5 RESULTADOS .....	21

5.1 Avaliação da ação leishmanicida de ROS para promastigotas <i>L. (L.) chagasi</i> .....	22
5.2 Avaliação da ação leishmanicida de ROS para amastigotas <i>L. (L.) chagasi</i> .....	22
5.2.1 Avaliação da ação leishmanicida de ROS para amastigotas <i>L. (L.) chagasi</i> das culturas de macrófagos murinos J774.16 tratados por LNMA .....	23
5.2.2 Avaliação da ação leishmanicida de ROS para amastigotas <i>L. (L.) chagasi</i> das culturas de macrófagos murinos J774.16 tratados por DETC, DETC/NAC.....	27
5.3 Avaliação dos níveis de ânion superóxido em sobrenadantes da infecção de macrófagos murinos J774.16 por <i>L. (L.) chagasi</i> resistentes e susceptíveis a ROS .....	31
5.4 Avaliação dos níveis de óxido nítrico em sobrenadantes da infecção de macrófagos murinos J774.16 por <i>L. (L.) chagasi</i> resistentes e susceptíveis a ROS .....	33
6 DISCUSSÃO .....	35
7 CONCLUSÕES .....	39
REFERÊNCIAS	

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada por parasitos do complexo *Leishmania donovani*, protozoários que apresentam um importante tropismo por células fagocitárias podendo originar infecção parasitária sistêmica grave (M.S., 2010).

O desenvolvimento de mecanismos protetores para leishmaniose visceral é influenciado por respostas microbidas dos macrófagos, mediante a síntese moléculas tóxicas, tais como o óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (BARRAL NETO et al., 1992). As moléculas reativas de oxigênio são formadas a partir do oxigênio molecular durante o ciclo redox, e compreendem a redução incompleta do oxigênio num sistema oxidante com a participação de radicais livres, tais como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e as hidroxilas (OH) (ASSECHE et al., 2011; BODGAN, 2002).

Diferentes atividades das moléculas reativas de oxigênio e nitrogênio veem sendo estudados quanto ao potencial leishmanicida. Estes estudos incluem atividades imunológicas relacionadas ao aumento da atividade microbida de células do sistema imunológico, como os macrófagos (BODGAN, 2002).

A fagocitose de promastigotas de *Leishmania* sp por macrófagos leva a ativação do burst oxidativo, evento marcado inicialmente pela elevada produção de ânion superóxido ( $O_2^-$ ), componente primário para formação de vários outros metabólitos tóxicos endógenos (ASSECHE et al., 2011; WANASEN et al., 2007). Vários modelos demonstram que a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês reactive species oxygen) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) leva à destruição de *Leishmania* (HORTA et al, 2012).

Contudo, algumas formas amastigotas apresentam mecanismos naturais de resistência a ROS (SANTOS et al., 2012 ; GUIDICE et al., 2007). Assim, supomos que isolados de *L. (L.) chagasi* apresentam viabilidades distintas quando expostos à menadiona (sistema de geração de espécies reativas de oxigênio).

As atividades das ROS sobre isolados de *Leishmania* sp podem ser inibidas por enzimas antioxidantes. A superóxido dismutase I (SODI), é uma das principais enzimas antioxidantes da *Leishmania*, em que a atividade desta enzima pode ser inibida pelo dietiltiocarbamato (DETC). A utilização do dietiltiocarbamato mostrou elevar o nível de ânion superóxido e interferir negativamente na viabilidade de amastigotas (KHOURI et al., 2010).

Apresentamos neste trabalho a influencia das ROS na viabilidade in vitro de isolados de *L. (L.) chagasi* e o padrão de infectividade em macrófagos murinos J774.16, linhagem celular produz concentrações mais elevadas de ROS, utilizada pela primeira vez num modelo in vitro de infecção com *Leishmania*.

## 2. REVISÃO LITERÁRIA

### 2.1 Leishmaniose Visceral

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, parasitas intracelulares do sistema mononuclear fagocítico do hospedeiro, pertencentes à Família Trypanosomatidae, Ordem Kinetoplastida (DESJEUX, 2001; M.S, 2005; WHO, 2010). As leishmanioses são enfermidades multifatoriais e complexas em decorrência de diversos fatores como as respostas imunológicas diferenciadas apresentadas pelos hospedeiros, os diferentes agentes etiológicos envolvidos em sua transmissão (cerca de 20 espécies de *Leishmania*), bem como a diversidade de vetores catalogados (30 espécies de flebotomíneos) (KILLICK-KENDRICK & RIOUX, 2002).

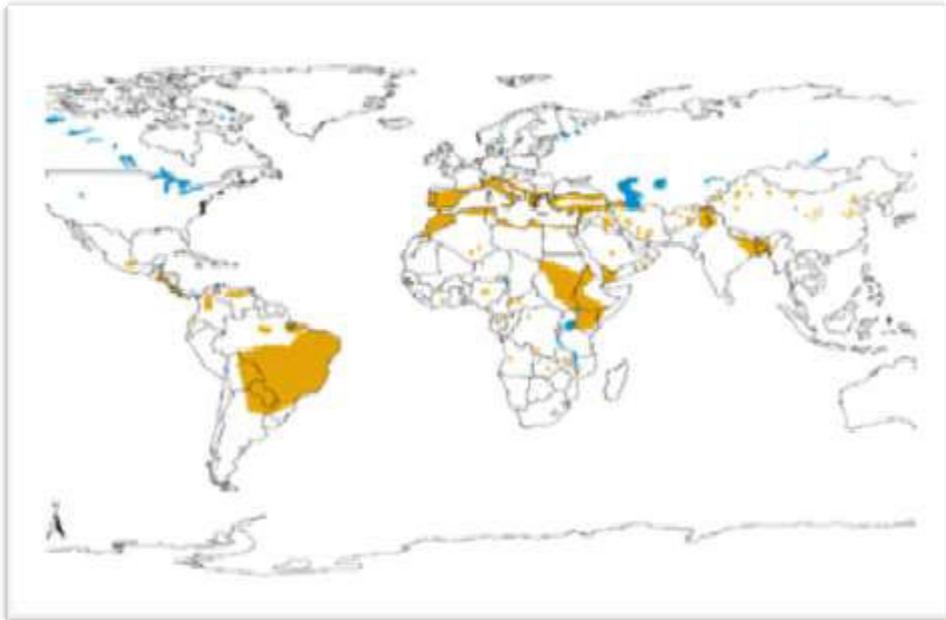
Aproximadamente 350 milhões de pessoas vivem em regiões endêmicas para leishmanioses (WHO, 2010). Dessas, 12 milhões podem desenvolver a leishmaniose visceral ou a leishmaniose tegumentar, ou uma de suas formas subclínicas (CHAPPIUS et al., 2007). Aproximadamente 90% de todos os casos de leishmaniose visceral são notificados em apenas cinco países: Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (**Figura 1**). Com relação à leishmaniose tegumentar, 90% de todos os casos de leishmaniose mucosa ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru; igual percentual de leishmaniose cutânea localizada é documentado no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria, variando de 1 a 1,5 milhão de novos casos relatados anualmente em todo mundo (CHAPPIUS et al., 2007; M.S., 2010).

Desde 1993 vem sendo verificada a expansão geográfica das regiões endêmicas para leishmaniose, com o registro crescente de número de casos oficialmente notificados (M.S., 2010). Tal crescimento se deve a um dos principais fatores de riscos que é o fenômeno mundial da urbanização, fortemente relacionado à intensificação das migrações (WHO, 2010). Fatores socioeconômicos, demográficos, culturais, políticos, religiosos e ambientais levam pessoas a abandonar suas cidades e até países, mudando-se para a periferia de grandes centros urbanos (MAGILL, 1995). Em 1950, menos de um terço da população mundial habitava em cidades. Atualmente, 50% delas habitam nos grandes centros urbanos. Na América do Sul mais de 70% da população é urbana, e como consequência dessa mudança, temos a urbanização de doenças endêmicas, antes restritas a zonas rurais (WHO, 2002).

Dados da Secretaria de Saúde do Estado de Sergipe indicam a ocorrência de 84 casos de leishmaniose visceral em 2006 e de 113 em 2007, distribuídos nas grandes cidades, como Aracaju (25% dos casos), Estância (10%) e Nossa Senhora do Socorro (5%). A incidência anual de casos de leishmaniose visceral em humanos em Sergipe é de 70-100 casos notificados na última década (M.S, 2007; SINAN, 2012).

## **2.2 *Leishmania* *Leishmania chagasi* é o agente etiológica da leishmaniose visceral nas Américas**

As espécies *L.(L.) donovani* e *L.(L.) infantum* são os agentes etiológicos envolvidos na transmissão da leishmaniose visceral em países da Ásia, África, Europa e do Oriente Médio. Nas Américas a *L. (L.) chagasi* é descrita como a espécie responsável pela leishmaniose visceral em humanos e canídeos (FOLLADOR et al., 2002). Estudos moleculares relatam sinonímia entre as espécies *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum*. Acredita-se que o parasito *L. (L.) infantum* tenha sido introduzido nas Américas no período da colonização portuguesa e espanhola (MAURÍCIO et al., 2000; LUKES et al., 2007). Entretanto, a infecção natural benigna documentada em raposa *Cerdocyon thous*, um canídeo originário da Amazônia, sugere uma relação antiga entre parasito-hospedeiro que poderá não estar associadas às colonizações estrangeiras, uma vez que foram observados diferentes perfis de restrição de kDNA e nas proteínas de superfície de promastigotas *L.(L.) chagasi* (LAINSON & RANGEL, 2003).

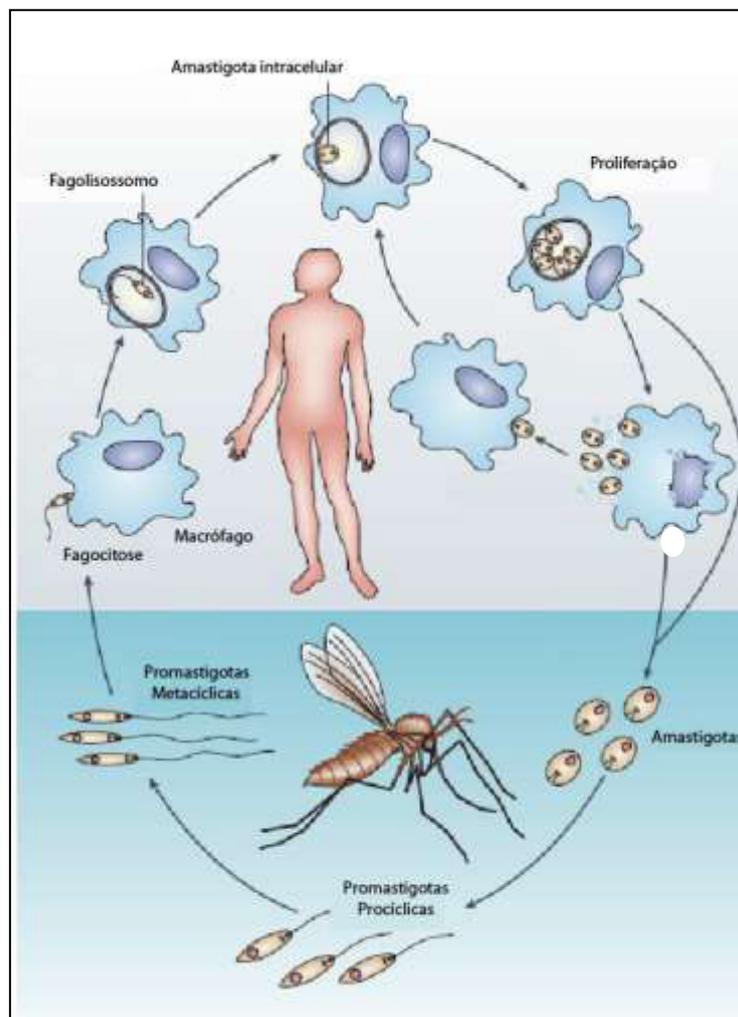


**Figura 1.** Mapa geográfico das áreas endêmicas da leishmaniose visceral (WHO, 2010)

### **1.3 Ciclo biológico da *Leishmania sp***

*Leishmania sp* é um parasito heteroxênico, cujo ciclo vital (**Figura 2**) envolve um hospedeiro intermediário invertebrado (flebotomíneo) e um hospedeiro mamífero vertebrado, homem e canídeos, (SACKS et al., 2002; STUART et al., 2008). Durante a hematofagia de flebotomíneos fêmeas infectadas, são inoculadas na pele do hospedeiro as promastigotas metacíclicas (forma infectante do parasito, flageladas, móveis e extracelulares), juntamente com produtos da glândula salivar do flebotomíneo, provocando vasodilatação e reação inflamatória local com recrutamento de células (AWASTHI, A. et al., 2004, de ALMEIDA, 2003). Nos fagócitos do hospedeiro as promastigotas são internalizadas em um vacúolo que se funde com lisossomos, denominado vacúolo parasitóforo ou fagolisossoma (BATES & ROGERS, 2004). Para escapar do ambiente ácido e de enzimas que possam destruí-las, as promastigotas se transformam em formas amastigotas (formas esféricas, imóveis e aflagelar) que resistem à ação lítica das proteases do vacúolo parasitóforo, podendo se replicar intensamente (BATES & ROGERS, 2004). A intensa multiplicação dos parasitos nesses vacúolos induz a ruptura da membrana celular e a liberação de amastigotas para a matriz extracelular. Essas amastigotas liberadas podem infectar fagócitos circunvizinhos (GONTIJO, 2003).

No flebotomíneo as amastigotas se transformam em promastigotas, a forma flagelada do parasito, completando dessa forma seu ciclo vital. (ANDRADE et al., 2007). Assim, quando os flebotomíneos se alimentam do sangue de um hospedeiro infectado, ingerem parasitos que irão se reproduzir no seu tubo digestivo, transformando-se novamente em promastigotas. No processo da metaciclogênese as promastigotas são transformadas em formas infectivas, promastigotas metacíclicas, na glândula salivar do flebótomo (ANDRADE et al., 2007, STUART, K. et al., 2008) (**Figura 2**), sendo essas formas que são inoculadas na pele dos hospedeiros mamíferos.



**Figura 2.** Ilustração do ciclo biológico da *Leishmania spp* obtida de CHAPPUIS et al., 2007.

#### **2.4 Reconhecimento da *Leishmania sp* por macrófagos**

Uma vez inoculada na pele de hospedeiro mamíferos, as promastigotas metacíclicas de *Leishmania* são fagocitadas. A fagocitose desses parasitos por

macrófagos envolve o reconhecimento de moléculas do parasito pelos receptores das membranas desses fagócitos. Exemplo disso são os receptores do sistema complemento (CR3), receptores para a fração constante (Fc) de imunoglobulinas e receptores do tipo lecitina, que podem interagir com sequências de carboidratos, glicoproteínas ou proteoglicanos, presentes na superfície dos parasitas (MOSSER et al, 2008; KEDZIERSKI et al., 2004).

O sistema complemento, formado por proteínas plasmáticas associadas às membranas, desempenha importante função nas respostas imunológica e inflamatória. A deposição de componentes do complemento na superfície de promastigotas de *Leishmania*, tal como o C3bi, foram necessários para que o parasito seja fagocitado por macrófagos via receptor CR3. Estudos de Ehlers (2000) propuseram o envolvimento do complemento e dois receptores, os receptores Mac-1 (CD11b/CD18/CR3), o receptor para C3bi e o CR1 (CD35) para C3b e C4b. Estes dois receptores atuam em cooperação, para mediar adesão de partículas ao macrófago e atividade fagocítica da *Leishmania*.

A gp63 (metaloprotease) e o LPG (lipofosfoglicano) são moléculas presentes em grandes quantidades na superfície da membrana das formas promastigotas de *Leishmania*. O LPG e gp63 ancoram-se à membrana por uma sequência de glicosilfosfatidilinositol e são os principais fatores de virulência da *Leishmania*. Essas moléculas ligam-se ao macrófago por receptores de manose/fucose (SACKS et al., 2000; ZAMBONI et al, 2012). A gp63, pode ainda aderir ao macrófago ligando-se seus receptores para fibronectina, mais especificamente a  $\beta$ 1-integrina (EHLERS, 2000). Outras moléculas do parasito com domínio rico em leucina (LRR), tais como o antígeno 2 da superfície do parasita (PSA-2) e o proteofosfoglicano de membrana (PPG) também se ligam aos receptores de superfície dos macrófagos através do CR3 (KEDZIERSKI et al., 2004).

A partir do reconhecimento e adesão ao macrófago, a *Leishmania sp* é fagocitada. O processo de fagocitose está associado com a ativação metabólica dos macrófagos, que desencadeia o burst oxidativo, gerando dois importantes tipos de moléculas tóxicas ao patógeno, as espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), a fim de conter a infecção (KEDZIERSKI et al., 2004; ASSECHE et al., 2011).

O processo de ativação da respiração oxidativa depende da translocação da proteína cinase-C (PKC) do citosol para a membrana das células, com eventos importantes ligados à fosforilação de proteínas celulares específicas pela PKC (BABIOR 2000; ASSECHE et al., 2011). Porém, moléculas da *Leishmania* conseguem modular a

atividade da PKC pela inibição da translocação dos componentes da NADPH oxidase, ou ainda podem interferir na transdução do sinal via PKC, que acaba impedindo a ativação do macrófago. O LPG é a principal molécula do parasita envolvida na modulação da PKC (RENNER et al., 1994; SACKS et al., 2000). Além do LPG, a gp63 também interfere a atividade das fosfatases (PTP), modificando a atividade da família de proteínas tirosinas cinases C e inibindo a produção intracelular de  $\text{IFN}\gamma$ , que conseqüentemente leva a redução dos níveis de óxido nítrico, IL-12 e TNF (OLIVIER et al., 2010).

A interação da *Leishmania* com macrófagos através dos receptores do complemento induz a opsonização do parasito (CARTER et al., 2009). Apesar do importante papel dos receptores do complemento e de sua ação lítica, as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* spp utilizam o CR3 para promover uma internalização no macrófago sem ativar as espécies reativas de oxigênio (ROS), (CARTER et al., 2009; ZAMBONI et al, 2012).

Contrariamente, a ativação dos receptores Toll-like (TLRs) são capazes de reconhecer padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), e recrutar a proteína adaptadora MyD88, desencadeando eventos de sinalização intracelulares em resposta à ativação do fator de transcrição e translocação do  $\text{NF-}\kappa\beta$ , que culmina com a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas pro-inflamatórias (ZAMBONI et al, 2012).

A produção de ROS e óxido nítrico é principalmente observada na ativação dos receptores TLR2 e TLR4 (KROPF et al., 2004a/b; MARCATO et al, 2008; ZAMBONI et al, 2012; SILVESTRE et al., 2009). Nas leishmanioses, a ativação do TLR2 induz a ativação de mecanismos microbicidas de macrófagos, com a produção de  $\text{O}_2^-$  e NO, bem como estimula a secreção das citocinas IL-12 e  $\text{TNF}\alpha$  (SILVESTRE et al., 2009; ZAMBONI et al, 2012).

## **2.5 Aspectos Imunológicos na Leishmaniose Visceral**

Diversos componentes celulares como macrófagos, células dendríticas (CDs), natural killer (NK) e os linfócitos ( $\text{CD4}^+$  e  $\text{CD8}^+$ ) são importantes no controle de *Leishmania*. Os macrófagos desempenham papéis cruciais na eliminação de *Leishmania*, a saber: fagocitam o parasito, secretando citocinas efetoras no controle e eliminação da

Leishmania e produzindo espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (CUMMINGS et al, 2010). Após a internalização da Leishmania, vários mecanismos de defesa dos macrófagos são desencadeados, especialmente a ativação do burst oxidativo, com a produção de  $O_2^-$  e NO, que estão diretamente envolvidas no controle e eliminação do parasito (BARRAL NETO et al., 1992).

As células natural killer (NK) são fundamentais no controle do parasito, são excelentes produtoras de IFN- $\gamma$ , citocina que ativam mecanismos microbicidas de macrófagos. Ainda na fase inicial da infecção, as células apresentadoras de antígenos, infectadas com Leishmania, produzem IL-12, que induzem as células natural killer a produzir IFN- $\gamma$ . (XIN et al, 2008; MOSSER et al, 2008). A atividade leishmanicida dos macrófagos depende também das citocinas produzidas pelos linfócitos T e B (XIN et al., 2008; CUMMINGS et al, 2010).

Os linfócitos T desempenham papel fundamental na resposta imunológica do hospedeiro a Leishmania. As células T CD4+, um subtipo de linfócito T, subdivide-se em diferentes subpopulações celulares, a saber: Th1, Th2, Th17, Th9 além de células T reguladoras (PETERSON et al., 2012; CROTTY et al., 2011), que desempenham papéis importantes no curso clínico-terapêutico das infecções por Leishmania (SCOTT et al., 2005).

O papel da ativação de clones Th1 ou Th2, determinando resistência ou suscetibilidade à leishmaniose, respectivamente, foi avaliado a partir de modelos experimentais de leishmaniose em camundongos, em que se distinguiram linhagens distintas no que diz respeito ao desenvolvimento de doença: camundongos suscetíveis (BALB/c) e resistentes (C3H/HeN) a L. (L.) major. Camundongos BALB/c desenvolvem uma resposta Th2 após a infecção com L. (L.) major, resultando numa doença severa e progressiva, enquanto os camundongos C3H/HeN desenvolvem uma resposta Th1, com produção de IFN- $\gamma$ , sendo então, capazes de controlar a infecção por L.(L.) major (HEINZEL et al., 1991; SCOTT, 1991).

Em pacientes assintomáticos para leishmaniose visceral observou-se alta produção de IL-12 e IFN $\gamma$  em monócitos de sangue periférico (CARVALHO et al.,1982). Semelhante, trabalhos de Alexander et al., (2012) descreve a resposta Th1 na LV é induzida por citocinas proinflamatórias, tais como IL-1 $\beta$ , IL-6,IL-18, IL-27.

Na leishmaniose visceral ativa a resposta imunológica é do tipo Th2, caracterizada pela produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, bem como a expressão de TGF- $\beta$

em tecidos infectados por *L. (L.) chagasi* (SAHA et al., 2007; RADWANSKA et al., 2007). As citocinas IL-4 e IL-13 associam-se com a susceptibilidade do hospedeiro à infecção por *Leishmania*, em decorrência da ativação de fatores de transcrição de STAT6, que interfere a atividade das células T por inibir síntese de IL-1 $\beta$  (ALEXANDER et al., 2012; CASTILHO et al., 2010).

A IL-10 participa da modulação da resposta imunológica, evitando dano tecidual causado pela produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF (NYLEN et al., 2007). Assim, os níveis de IL-10 são necessários para equilíbrio de resposta imune no processo de doença ativa.

Em geral, os indivíduos que desenvolvem a forma ativa da leishmaniose visceral apresentam baixa capacidade linfoproliferativa, redução de IL-12 e IFN $\gamma$ , como pode ser demonstrado pela estimulação de células mononucleares do sangue periférico em resposta aos antígenos de *L.(L.) chagasi* e *L.(L.) donovani* (SACKS et al., 1987; CARVALHO et al., 1982).

O papel de células Th17 na infecção por *Leishmania* é ainda assunto controverso, embora existam indícios de que exerça função protetora na leishmaniose visceral (KUMAR e NYLEN, 2012). A Th17 requer um microambiente com IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A e IL-23 (VOLPE et al., 2008). Moseley et al (2003) demonstraram que a IL-17 liga se ao IL-17R (encontrado em vários tecidos, dentre eles o baço, fígado, rim e pulmão), mediando a produção de citocinas pró-inflamatórias, que ativam a cascata de sinalização de transcrição do NF- $\kappa$ B e AP1 (CAO, 2000). Esses eventos podem contribuir no controle da infecção em órgãos alvos dos parasitos *L.(L.) donovani* e *L.(L.) chagasi* (LOPES et al., 2009).

## **2.6 Espécies reativas de oxigênio (ROS) e sua atividade leishmanicida**

As ROS são os produtos da redução intermediária do oxigênio em meio aquoso o radical superóxido ( $O_2^-$ ), o oxigênio singleto ( $O_2$ ), o radical hidroxila (OH), o ânion hidroxila ( $OH^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), bem como os produtos da reação desses intermediários com haletos e amins (NATHAN et al., 2000; FARIA et al., 2011). Em geral, as ROS são importantes moléculas tóxicas com atividade

leishmanicida (WILSON et al, 1994; FONSECA-SILVA et al., 2011; KHOURI et al., 2010).

A produção intracelular da ROS se dá com a fagocitose do parasito, sendo a opsonização do patógeno através dos receptores de membrana, um forte estímulo da sua produção *in vitro*, tanto em macrófagos humanos quanto em macrófagos murinos (ASSECHE et al., 2011; FARIA et al., 2011).

As ROS promovem o ataque aos componentes celulares, tais como os ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, provocando danos como a inativação de enzimas, alteração da permeabilidade da membrana e mutações que podem conduzir à morte celular dos patógenos (HOLZMULLER et al., 2006; MILLER et al., 2000).

Os efeitos tóxicos diretos do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e do peróxido de ( $H_2O_2$ ) tem sido demonstrado *in vitro* para a *Leishmania*, de modo que a suscetibilidade a ROS foi dependente do estágio do parasito. As promastigotas metacíclicas foram mais resistentes comparadas com as procíclicas (WILSON et al, 1994; GANTT et al., 2001; ASSECHE et al., 2011).

A atividade leishmanicida associada à produção de ânion superóxido apresentam efeitos moleculares oxidativos direto sobre as membranas da mitocôndria do parasito, levando a disfunção do cinetoplasto (FONSECA-SILVA et al, 2011; KHOURI et al, 2010). Enquanto que o peróxido de hidrogênio mostrou-se tóxico em decorrência da degradação do DNA e ativação das caspases, levando à morte de *Leishmania sp* por apoptose (DAS, 2001).

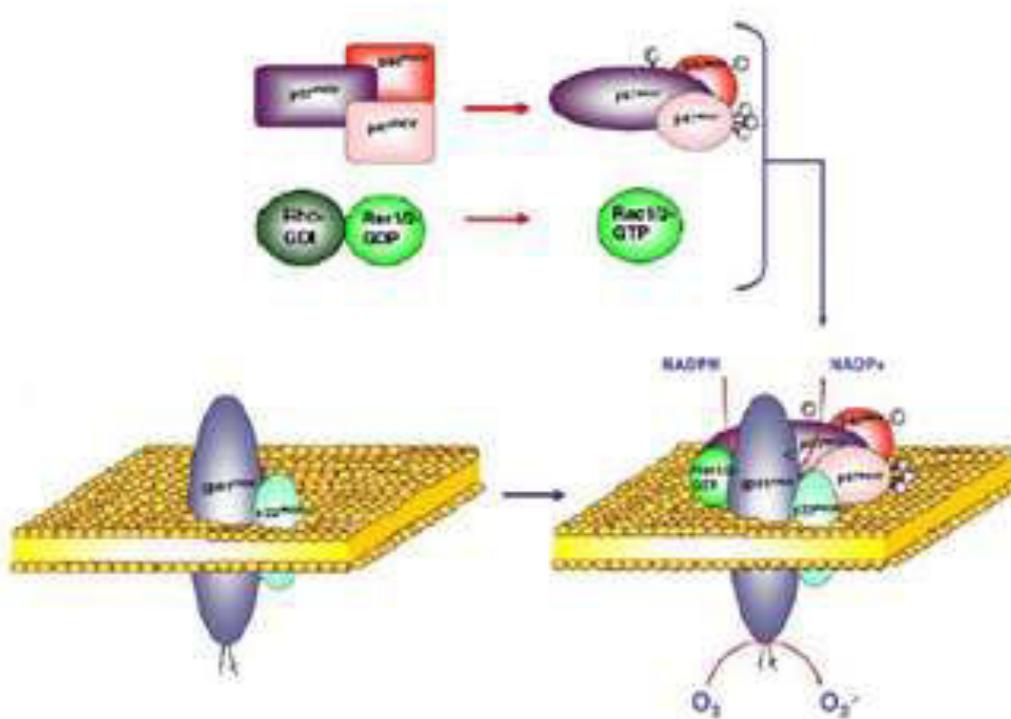
A produção de peróxido de hidrogênio foi observada em monócitos do sangue periférico de pacientes com leishmaniose, cujos níveis basais desse radical mais elevado do que os monócitos de indivíduos normais (SALDANHA et al, 2009). Saldanha e colaboradores (2001) demonstraram *in vitro* que monócitos humanos estimulados por acetato de forbol miristático (PMA) também exibiam níveis aumentados de peróxido de hidrogênio. Outras ROS são produzidas pelo estímulo de PMA, tais como superóxido e hidroxila, e participam na eliminação da *Leishmania sp* (PICK e MIZEL, 1981).

A produção de ROS é aumentada, como já mencionado, com a fagocitose e opsonização do parasito. As ROS ainda podem resultar de produtos do metabolismo aeróbico celular na atividade mitocondrial que ocorre com o transporte de elétrons produzidos das coenzimas reduzidas (FADH e NADH) passando pelos quatros complexos associados à membrana mitocondrial interna até o  $O_2$ , (WIESE et al., 1995; FONSECA-SILVA et al., 2011).

A nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato oxidase (NADPH oxidase), catalisa a transferência de prótons do oxigênio molecular ( $O_2$ ), produzindo  $O_2^-$  (seu produto principal), que por sua vez pode ser convertido sob ação da enzima superóxido dismutase a  $O_2$  e  $H_2O_2$ , formando novas moléculas reativas (EL BRENNNA et al., 2008).

A NADPH oxidase, consiste num sistema multicomplexo enzimático que se organiza a partir de estruturas transmembranas e proteínas (p22phox gp91phox/NOX2, juntas para formam o citocromo  $b_{558}$ ), de proteínas citosólicas (p47phox, p67phox, p40phox) e uma GTPase (Rac1 ou RAC2), (EL BRENNNA et al., 2008; ASSECHE et al., 2011).

A montagem do complexo NADPH, envolve a fosforilação de proteica, ativação da GTPase e translocação de componentes citosólicos da membrana. Este evento pode ser induzido por um grande número de fatores particulados e solúveis, tais como  $IFN-\gamma$ , IL-8, imunoglobulina G (IgG) e por produtos microbianos como lipopolissacarídeo (LPS) e lipoproteínas (BOGDAN, 2001; EL BRENNNA et al., 2008). **Figura 3.**



**Figura 3:** Ilustração modificada do complexo NADPH oxidase. Fonte: El Brenna et al., 2008.

Embora as ROS interfiram na viabilidade da *Leishmania*, este patógeno é capaz de desenvolver mecanismo de desintoxicação a moléculas reativas de oxigênio, por um mecanismo que envolve a síntese de enzimas antioxidantes, a saber a superóxido dismutase (SOD) e peroxidoxinas (GHOS, 2003). A atividade das SODs foi observada em *Escherichia coli*, pela transfeccção de um vetor de expressão, passando o organismo transfectado a apresentar resistência a drogas doadoras de radicais livres. Além disso, a *Leishmania tropica* knockout para SOD demonstraram maior sensibilidade a moléculas reativas oxidantes, quando exposta a menadiona e peróxido de hidrogênio (GHOS, 2003).

Segundo trabalhos de Meshnick e Eaton (1984), foram identificados clonados em *L. (L.) chagasi* de dois tipos de gene para expressão de SOD (SOD-A e SOD-B), conforme estágio do ciclo biológico, observando-se que formas promastigotas apresentam nível elevado de SOD. As superóxido dismutase (SOD) dismuta o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, e são comumente encontradas nos protozoários do gênero *Leishmania* sob três isoformas: CuZnSOD/SODI, MnSOD/SODII e FeSOD/SODIII (MILLER et al., 2004; GHOS, 2003; ASSCHE et al., 2011).

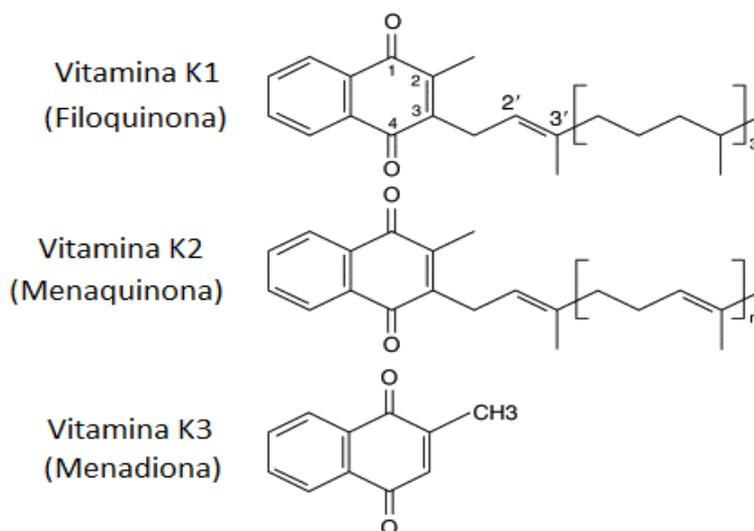
Após infecção, macrófagos exibem níveis elevados de SODI na tentativa de promover equilíbrio entre as respostas oxidativas versus antioxidante, esse evento é favorável para sobrevivência da leishmania. No entanto, a utilização *in vitro* de inibidores enzimáticos para a superóxido dismutase I (SODI), proporcionaram aumento para atividade leishmanicida em macrófagos humanos e murinos, resultando num eficiente controle de amastigotas relacionado com níveis elevados de ânion superóxido (KHOURI et al, 2010).

## **2.8 O Ciclo Redox da Menadiona (vitamina K3)**

A Vitamina K é uma família de compostos isoprenoides hidrossolúveis, estruturalmente similares, formados por 2-metil-1,4-naftoquinonas. Fazem parte desse grupo a filoquinona (Vitamina K1), menaquinona (Vitamina K2) e um análogo sintético, menadiona (Vitamina K3), cujas estruturas químicas estão representadas na figura 3. As vitaminas K1 e K2 diferem somente no grupo prostético que se liga ao C-3 da quinona (**Figura 4**). A vitamina K1 possui um grupo fitil (uma unidade isoprenoide

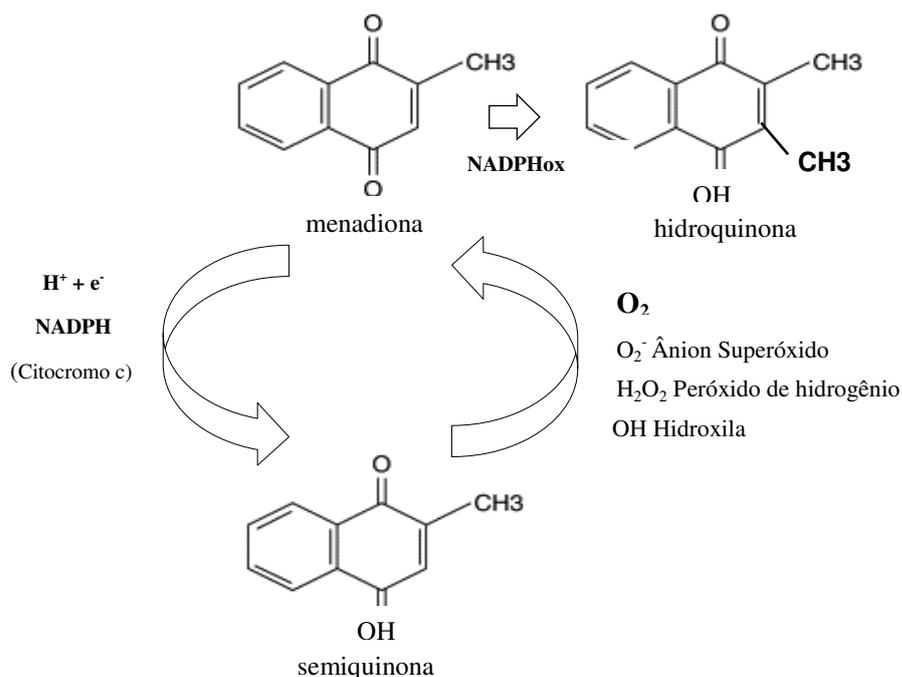
parcialmente saturada) na posição 3, enquanto a vitamina K2 possui um grupo isoprenil poliinsaturado nessa mesma posição.

A menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) é uma quinona sintética, similar em estrutura a ubiquinona ou coenzima Q, um isoprenoide transportador de elétrons. Diferentemente da filoquinona e da menaquinona, a menadiona não possui uma cadeia alifática composta por poliisoprenos (**Figura 4**), parcialmente ou completamente insaturadas ligada ao carbono 3 (OZTOPÇU et al, 2004).



**Figura 4.** Estruturas das vitamina K, filoquinona (vitamina K1), menaquinona (vitamina K2) e menadiona (vitamina K3), um análogo de vitamina K.

Como outras quinonas, a menadiona pode se submeter a um ciclo redox, que envolve sua redução enzimática, cuja reação envolve a participação de enzimas oxirredutases, que utilizam as coenzimas NADPH ou NADH como fontes de elétrons. Essas enzimas catalisam reações que promovem a transferência de elétrons para a quinona, reduzindo-a a uma forma parcialmente reduzida, semiquinona. A semiquinona transfere então um elétron para o oxigênio molecular, que produzirá espécies reativas do oxigênio (ROS) como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) (Bolton et al. 2000, Gutierrez, 2000). As quinonas podem ser reduzidas também pela recepção de dois elétrons produzindo hidroquinonas (**Figura 5**), sem produzir ROS.



**Figura 5.** Ciclo redox da menadiona e produção de ROS modificado, Vermeer et al (1995).

O ciclo-redox das quinonas pode ser interrompido na presença de agentes antioxidantes do tipo tiol, como a glutatona, um derivado do N-acetilcisteína (NAC). Essa interrupção se deve a arilação do grupo sulfidril da glutatona pela menadiona, que forma uma molécula estável, levando à depleção de ambos os compostos (LAMSON & PLAZA, 2003).

Sabe-se que as ROS são moléculas tóxicas para promastigotas e amastigotas de *Leishmania* (MILLER et al., 2000; GANTT et al., 2001; KHOURI et al 2010). Porém, ainda há poucos estudos sobre a ação de ROS para *Leishmania* (*L.*) *chagasi*, agente etiológico responsável pela endemicidade da leishmaniose visceral (VL) no Brasil. Desta forma, avaliamos *in vitro* a atividade leishmanicida das espécies reativas de oxigênio para *Leishmania chagasi*, pela exposição das promastigotas a menadiona (doador de ROS), cujos isolados foram oriundos de pacientes do projeto LV Brasil do Estado de Sergipe. Além disso, foram realizados estudos adicionais da viabilidade de suas respectivas formas amastigotas em macrófagos murinos J774.16 (células produtoras de ROS), com intuito de demonstrar os mecanismo de replicação parasitária numa linhagem de macrófagos murinos J774.16. Nossa hipótese que os isolados de promastigotas de *Leishmania* (*L.*) *chagasi* apresentam distintamente susceptibilidade e resistência natural a ROS, podendo exibir igual fenótipo para formas amastigotas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar a ação leishmanicida de espécies reativas do oxigênio para promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar a ação leishmanicida de ROS para promastigotas de *L.(L.) chagasi* pela exposição a menadiona (que gera ROS em seu ciclo redox);
- Avaliar a ação leishmanicida de ROS para amastigotas derivadas de promastigotas de *L. (L.) chagasi* resistentes e susceptíveis a ROS em macrófagos murinos J774.16;
- Avaliar a produção de ânion superóxido e óxido nítrico em sobrenadante de culturas de macrófagos murinos J774.16 infectados por *L.(L.) chagasi* resistentes e susceptíveis a ROS.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

**4.1. Parasitos.** Nesse estudo foram utilizados promastigotas de *L. (L.) chagasi* do criobanco de leishmania do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Medicina da UFS. Esses parasitos foram obtidos de pacientes com leishmaniose visceral, participantes de projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFS, sob o número CAEE-0151.0.107.

**4.2. Cultura de *L. (L.) chagasi*.** As promastigotas de *L. (L.) chagasi* foram descongeladas e cultivadas em meio bifásico com ágar sangue Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) por três dias e expandidas em meio Schneider, suplementado com soro bovino fetal e penicilina (Schneider completo) e mantidas em estufa a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  e aerada com 5% de  $\text{CO}_2$ . Essas culturas eram examinadas diariamente e os parasitos contados em câmara de Neubauer em microscópio óptico, para determinação da curva de crescimento.

**4.3. Curva de crescimento de *L. (L.) chagasi*.** Após três dias da passagem do parasita do meio NNN bifásico para o meio Schneider, iniciou-se a avaliação da curva de crescimento do parasita para determinar as fases logarítmica e estacionária de crescimento de cada isolado selecionado. Foi retirada uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da cultura de leishmania do meio NNN e transferiu-se para uma garrafa de cultivo de 50 mL, contendo 2 mL de Schneider completo. Essa cultura foi incubada a  $24^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Foi realizada uma contagem diária do parasita/mL em câmara de Neubauer em microscópio óptico.

**4.4. Cultivo da linhagem de macrófagos murinos J774.16.** A linhagem de macrófagos murinos J774.16, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Carlos Taborda Pellechi (Laboratório de Microbiologia do Departamento de Fungos Dimórficos da Universidade de São Paulo). Estoques de J774.16 (previamente congeladas a  $-80^\circ\text{C}$ ) foram descongelados a temperatura ambiente ( $37^\circ\text{C}$ ). Em seguida, essas células foram suspensas em NaCl 0,15M e centrifugadas duas vezes a 1500 rpm, por 10 minutos, a uma temperatura de  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e o “pellet” de células foi suspenso em RPMI completo, transferidas para frascos de culturas e incubadas a temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , em estufa aerada com 5% de  $\text{CO}_2$ , por cinco dias. Após cinco dias de cultivo, as células aderidas à parede do frasco de cultura foram soltas por atrito

mecânico e utilizadas nos experimentos de infecção com promastigotas de *L. (L.) chagasi* resistentes e susceptíveis a ROS.

**4.5. Avaliação in vitro da ação leishmanicida de ROS para promastigotas de *L. (L.) chagasi* expostas a concentrações crescentes de menadiona.** A avaliação da ação leishmanicida de ROS para promastigotas de *L. (L.) chagasi*, expostas à concentrações crescentes de menadiona (0-750 $\mu$ M), foi determinada pela contagem direta dos parasitos vivos em microscópio óptico. As promastigotas de *L. (L.) chagasi* (em fase logarítmica de crescimento) foram ajustadas a uma concentração de  $5 \times 10^7$  parasitas/mL em HBSS pH 7.0 e distribuídas em placas de 96 poços (fundo em U), em alíquotas de 100 $\mu$ l, contendo  $10^6$  parasitos por poço. Concentrações crescentes de menadiona (0-750 $\mu$ M) foram adicionadas em cada poço da placa, cujo volume final foi de 100 $\mu$ l. As placas foram incubadas a 24°C por 2 horas. Após esse período de incubação, foi determinada a viabilidade das promastigotas, pela contagem direta em microscópio óptico dos parasitos que exibiam motilidade. O percentual de viabilidade foi calculado por divisão do número de parasitos vivos exposto à menadiona pelo número de parasitos vivos não expostos (controles) e multiplicado por 100. Esse percentual foi determinado por dois avaliadores independentes, que desconheciam as condições do experimento. Os resultados da ação leishmanicida de ROS para promastigotas de *L. (L.) chagasi* representam a média de três análises experimentais, cada uma delas feita em duplicata.

**4.6 Avaliação da ação leishmanicida de ROS para amastigotas dos isolados de *L. (L.) chagasi*.** Para avaliar da ação leishmanicida de ROS para formas amastigotas de *L. L. chagasi*, um isolado resistente e dois susceptíveis a ROS (ambos os fenótipos na forma de promastigotas em fase estacionária de crescimento) foram utilizados para infectar uma linhagem de macrófagos murinos J774.16, produtora de NO e O<sub>2</sub><sup>-</sup> quando ativadas in vitro por LPS e IFN- $\gamma$ . Os macrófagos murinos da linhagem J774.16 foram previamente ativados com LPS (100 ng/ml) + IFN- $\gamma$  (10ng/ml) por 1 hora, antes da infecção a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. As culturas de macrófagos não ativadas foram utilizadas como controles. Após essa incubação todas as placas de culturas foram lavadas com NaCl 0,15M e infectadas com promastigotas de *L. (L.) chagasi*, em fase estacionária de crescimento, na proporção de 5:1 (parasito/macrófago) em placas de oito poços. As placas foram incubadas por 2 horas em estufa a 37°C e aerada com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período de incubação, os parasitas extracelulares foram removidos por lavagem das

placas com NaCl 0,15M. Os sobrenadantes das culturas de 4 horas de infecção foram coletados, armazenados e as placas coradas com Panótipo. As culturas de macrófagos murinos J774.16 foram tratadas com 1mM de dietilditiocarbamato (DETC) e incubadas por 24, 48 e 72 horas. As culturas tratadas com o estímulo combinado de DETC 1mM e NAC 1mM (DETC/NAC) foram incubadas por 24, 48 e 72 horas. Com relação ao estímulo da culturas de J774.16 tratadas com N<sup>G</sup>-Metil-L-Arginina 1mM (LNMA-), um dos inibidores de iNOS, por 24, 48 e 72 horas. Ao fim de cada período de incubação todas as placas foram lavadas duas vezes com NaCl 0,15M, os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados a -20 °C, para dosagem dos níveis produzidos de óxido nítrico. As placas foram fixadas e coradas com Panótipo e o número de amastigotas por 100 macrófagos (carga parasitária) foi avaliado em lâminas codificadas por três observadores independentes (que desconheciam as condições do experimento), cada um deles contando 100 células. Os resultados desses experimentos são médias de três ensaios foram feitos em diferentes ocasiões cada um deles realizados em duplicata.

**4.7 Quantificação de Superóxido.** Os níveis do ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) em sobrenadante de culturas de macrófagos murinos J774.16 foram determinados pelo método espectrofotométrico de redução do ferricitocromo c. Nessa reação, o O<sub>2</sub><sup>-</sup> atua como um doador de elétrons, reduzindo o Fe<sup>3+</sup> citocromo c a Fe<sup>2+</sup> (GREEN et al., 1994). A microplaca de 96 poços contendo culturas de macrófagos J774.16 infectadas por *L. (L.) chagasi* nas condições controle; DETC; DETC/NAC; L-NMA foram lavadas com HBSS estéril após o término do tempo de infecção (4, 24, 48 e 72 horas). Em seguida, nos poços da primeira duplicata das amostras pipetou-se 65µl de HBSS estéril + 25 µl de ferricitocromo c (2.7mg/mL) + 10 µl de PMA (10µg/mL). Nos demais poços correspondentes a segunda duplicata das amostras foram pipetados 59µl de HBSS estéril + 25 µl de ferricitocromo c (2.7mg/mL) + 10µl de PMA (10µg/mL) + 6 µl de SOD (1mg/mL). Em seguida, a microplaca de 96 poços foi incubada por 60 minutos em estufa à 37°C em proteção de luz. Após essa incubação, foram transferidos todos os sobrenadantes das amostras para outra microplaca de 96 poços, acrescentando dois poços controles, um deles contendo 100 µl água (branco) e o outro contendo 65 µl de HBSS estéril + 25 µl de ferricitocromo c (2.7mg/mL) + 10 µl de PMA (10µg/mL). A redução citocromo c foi determinada pela absorbância óptica em filtro de 540nm em duas leituras. A primeira leitura procedeu-se sem adição de ditonito de sódio. Na segunda leitura, foram adicionados 10 µl de ditonito de sódio (1mg/mL). A quantidade

de  $\text{Fe}^{3+}$  citocromo c reduzido por ditionito de sódio foi calculada como a fracção do total de  $\text{Fe}^{3+}$  citocromo c de redução (PICK e MIZEL, 1983). As concentrações de  $\text{O}_2^-$  foram calculadas em nmol a partir da seguinte fórmula (Pick e Mizel, 1981):  $\text{nmol O}_2^- \text{ liberado} = (\text{experimental} - \text{SOD}) \times \text{ditionito\% reduzido} \times 10,9 \text{ nmol}$

**4.8 Dosagem de óxido nítrico.** Os níveis de óxido nítrico em sobrenadante de culturas de macrófagos murinos J774.16 foram determinados pela dosagem de nitrito através do método colorimétrico de Griess, modificado por Giudice et al., 2007. Neste método, o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Este produto reage com N-naftil-etilenodiamina formando um composto azo estável, de coloração púrpura, detectado na faixa de comprimento de onda de 490 a 540 nm. Em microplaca de 96 poços foram pipetados 50  $\mu\text{l}$  dos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados por L. (L.) chagasi e 50  $\mu\text{l}$  do reagente de Griess, seguido de incubação das placas por 10 minutos à temperatura ambiente. As concentrações de nitrito foram calculadas a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio. Os registros de absorbância foram realizados no comprimento de onda de 540nm.

**4.9. Análise Estatística.** Para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney com intervalo de confiança de 95%. Em ensaio de viabilidade a comparação entre 3 os mais grupos foi analisada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós teste Dunnett's, com intervalo de confiança de 95%. Os dados foram analisados utilizando software GraphPad-Prisma5 (Graphpad software, San Diego, CA=USA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação da ação leishmanicida de ROS para promastigotas *L. (L.) chagasi*.

A avaliação da ação leishmanicida de ROS para as 16 promastigotas de *L. (L.) chagasi*, produzidas a partir do ciclo redox da menadiona (quinona sintética, análogo de vitamina K resultou em perdas de viabilidades dessas promastigotas a depender da concentração dessa quinona. Assim, quando expostas a concentrações crescentes de menadiona (0-750 $\mu$ M) observamos que os isolados mais susceptíveis à ação leishmanicida de ROS, apresentavam perda de 50% de suas viabilidades em concentrações de 16 e 32 $\mu$ M de menadiona (S7, S9, S11 e S14). Sob concentrações de 250 $\mu$ M, 31% dos isolados apresentaram decréscimo de 50% de viabilidade. Sob a concentração de 500 $\mu$ M, 69% deles apresentaram viabilidades  $\leq$  50%. Sob concentrações de 750 $\mu$ M, apenas dois isolados (R1 e R2) apresentaram percentuais de 70 e 89% de viabilidade respectivamente (Tabela 1). Portanto, as promastigotas de *L. (L.) chagasi* que apresentaram perdas de 50% ou mais de viabilidade a 750  $\mu$ M de menadiona foram classificadas como susceptíveis a ROS, enquanto as que apresentaram 70% ou mais de viabilidade foram classificadas como resistentes a ROS (R1 e R2), sendo todas as promastigotas oriundas de pacientes diferentes com VL.

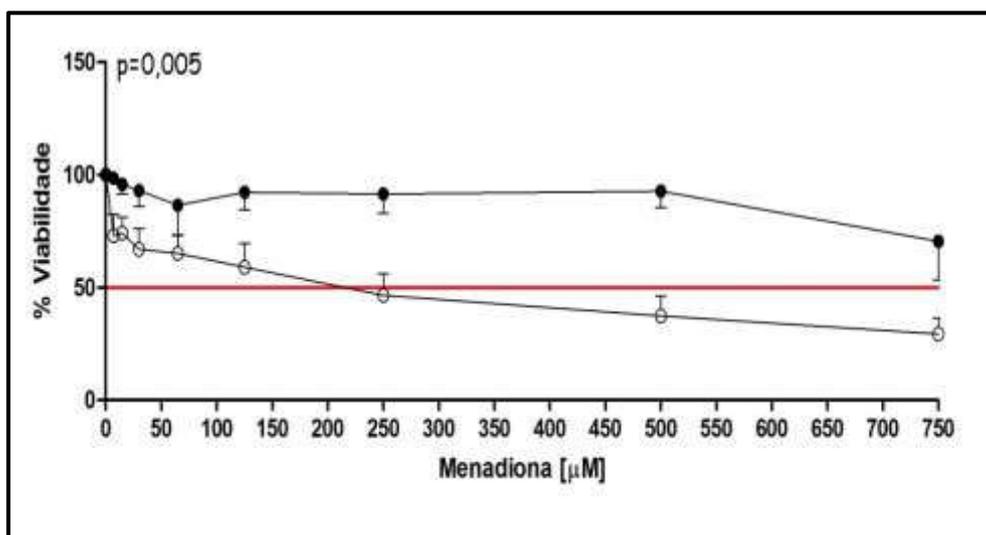
**Tabela 1:** Percentual de viabilidade dos isolados *L. (L.) chagasi* expostos à menadiona.

Menadiona ( $\mu$ M)	*S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	**R1	R2
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
8	100	100	100	72	100	100	90	100	80	100	100	80	100	100	94	100
16	100	100	100	69	90	100	70	98	51	100	80	75	100	50	93	100
32	96	80	100	82	100	100	50	96	50	100	53	65	100	12	82	100
62	98	60	100	73	100	100	30	90	32	100	50	61	81	15	80	100
125	69	83	100	70	100	85	15	84	25	100	30	50	84	6	79	100
250	60	51	93	57	80	76	3	68	16	83	22	28	69	3	75	100
500	50	34	50	30	50	50	1	53	11	67	5	18	60	1	71	90
750	43	8	40	30	40	42	0	45	4	50	3	0	47	0	70	89

\*S – *L. (L.) chagasi* susceptível a ROS.

\*\*R – *L. (L.) chagasi* resistentes a ROS.

Os isolados resistentes a ROS apresentaram percentuais de viabilidade de  $90 \pm 69\%$  quando exposto a  $750 \mu\text{M}$  enquanto que susceptíveis observou-se  $50 \pm 17\%$ . A diferença entre as viabilidades das promastigotas de *L. (L.) chagasi* susceptíveis a ROS comparada com as das formas resistentes a esse agente leishmanicida foi estatisticamente significativa ( $p=0,005$ ), conforme demonstrado na figura 6.



**Figura 6** - Percentual de viabilidade dos isolados de *L. (L.) chagasi* expostos a concentrações crescentes de menadiona (0-750 $\mu\text{M}$ ).  $\circ$  *L. (L.) chagasi* susceptível a ROS (n=14) e  $\bullet$  *L. (L.) chagasi* resistente a ROS (n=2). \* $p=0,005$  (teste de Kruskal - Wallis).

## 5.2 Avaliação da ação leishmanicida de ROS para as amastigotas de *L. (L.) chagasi*.

Na avaliação da ação leishmanicida de ROS para as formas amastigotas de *L. L. chagasi*, infectamos uma linhagem celular de macrófagos murinos J774.16 com um isolado resistente (R2) e dois isolados susceptíveis a ROS (S7 e S14), em diferentes condições experimentais incubados com o inibidor da enzima SOD-1, DETC - para aumentar a produção do ânion superóxido e o inibidor de iNOS - para bloquear a síntese de óxido nítrico.

Analizamos os resultados obtidos com esses experimentos considerando duas diferentes abordagens a saber:

- **Comparação do número de amastigotas dentro de cada grupo de macrófagos J774.16 infectados por um isolado resistente ou susceptível a ROS.** Nesta abordagem, comparamos os números de amastigotas dos controles de cada uma dessas culturas de macrófagos murinos J774.16 infectadas por isolados (individualmente), com as cargas parasitárias de suas culturas infectadas nas condições experimentais ( tratadas com L-NMA, DETC e DETC/NAC), como também entre as cargas parasitárias das culturas celulares infectadas nestas condições experimentais.
- **Avaliação de variação no número de amastigotas ao longo dos períodos de infecção.** Avaliamos variações nos números de amastigotas para cada uma das culturas de macrófagos murinos J774.16 infectadas tanto pelos isolados susceptíveis quanto o resistente a ROS (para cada uma das condições de infecção), ao longo dos diferentes tempos de incubação (4, 24, 48 e 72 horas de infecção).

### **5.2.1 Avaliação da ação leishmanicida de ROS para as formas amastigotas de *L. (L.) chagasi* das culturas de macrófagos murinos J774.16 tratadas com LNMA.**

Objetivando avaliar a contribuição de ROS como agente leishmanicida sobre as amastigotas de *L. L. chagasi*, infectamos culturas de macrófagos murinos J774.16 com promastigotas de *L. L. chagasi* susceptíveis e resistente a ROS nas seguintes condições de infecção: culturas controles (para avaliar apenas a ação de ROS, uma vez que a fagocitose do parasito estimula a produção desses oxidantes) e a inativação da enzima iNOS pela incubação das culturas com L-NMA (para bloquear a síntese de NO).

## **Comparação do número de amastigotas dentro de cada grupo de célula infectada por um isolado específico (ou resistente ou susceptível a ROS).**

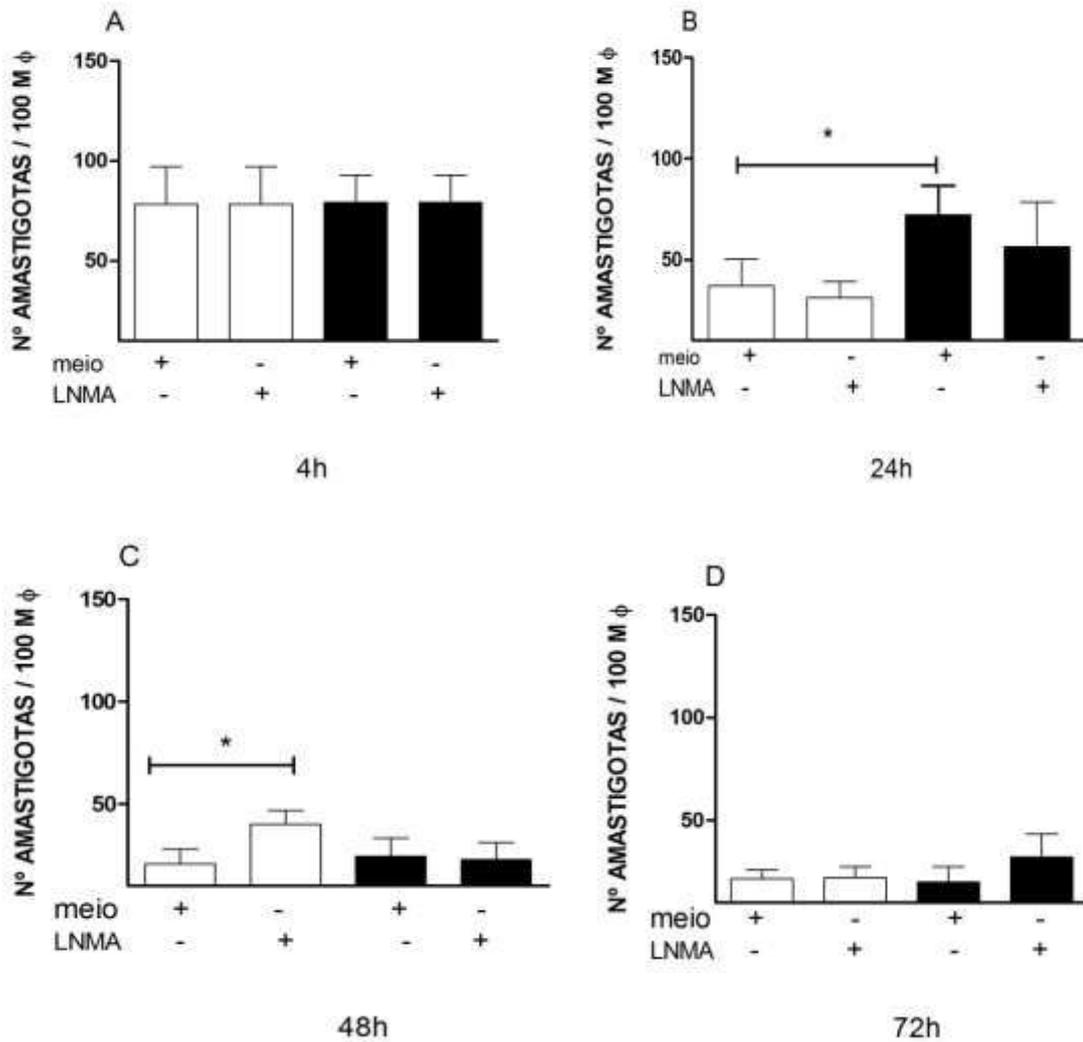
Comparando as cargas parasitárias de linhagem susceptíveis para o tempo de 4 horas de incubação das culturas (controles) de macrófagos murinos J774.16 infectadas em condições controle com as cargas parasitárias das culturas de células J774.16 infectadas nas condições experimentais (tratadas com L-NMA), não observamos diferenças significativas entre os números de amastigotas entre elas ( $133 \pm 20$ ) ( $130 \pm 40$ ) (**Figura 7A**). Resultados semelhantes são encontrados quando avaliamos esses dados para as culturas de macrófagos murinos J774.16 infectadas pelo isolado resistente, nessas mesmas condições, em que o número de amastigotas das culturas controles não diferiram significativamente das cargas parasitárias das culturas das condições experimentais ( $120 \pm 24$ ) ( $100 \pm 22$ ) (**Figura 7A**).

Comparando as cargas parasitárias para o período de 24 horas de infecção, observamos que as culturas de macrófagos murinos J774.16 infectadas pelos isolados susceptíveis apresentaram números de amastigotas similares nas culturas incubadas nas condições controle/meio ( $100 \pm 20$ ) ou tratadas com L-NMA ( $76 \pm 22$ ) (**Figura 7B**). As cargas parasitárias das culturas infectadas pelo isolado resistente foram mais baixas quando tratadas com L-NMA ( $54 \pm 16$ ), mas essas diferenças também não foram significativas (**Figura 7B**).

Com relação ao período de 48 horas de infecção (**Figura 7C**), observamos que as culturas de macrófagos murinos J774.16 (controles) infectadas pelos isolados susceptíveis apresentaram números de amastigotas menores ( $60 \pm 10$ ) do que os de suas culturas infectadas nas condições tratadas com L-NMA ( $71 \pm 15$ ). Observamos diferenças significativas quando comparamos os números de amastigotas das culturas controle comparadas as culturas tratadas com L-NMA,  $p = 0.025$  (**Figura 7C**). As culturas de J774.16 infectadas pelo isolado resistente apresentaram baixas cargas parasitárias para as duas condições de infecção para o período de 48 horas de infecção (meio e tratadas com L-NMA) ( $45 \pm 19$ ), ( $43 \pm 20$ ) não sendo observada entre elas qualquer diferença estatisticamente significativa (**Figura 7C**).

Os números de amastigotas das culturas de macrófagos murinos J774.16 infectadas tanto pelos isolados susceptíveis quanto pelo isolado resistente a ROS são

baixas no tempo de 72 horas de infecção para qualquer das condições de infecção avaliada (**Figura 7D**).



**Figura 7:** Infecção de macrófagos murinos J774.16 por L.(L.) chagasi susceptíveis (Barra branca) e resistente a ROS (Barra preta) incubados com LNMA: L.(L.) chagasi susceptível (n=2) / resistente as ROS (n=1) após tratamento com LNMA nos períodos de 4h (7A), 24h (7B), 48h (7C) e 72 horas de infecção (7D). O número de amastigota foi determinado por contagem do número de 100 macrófagos por campo sob microscopia óptica. Dados são representativos de um experimento representativo de 2 experimentos independentes feito em duplicata de cada isolado. Barras representam média  $\pm$  SD. \*p=0,038; \*p=0,025 (Teste de Mann Whitney)

## **Avaliação de variação nos números de amastigotas ao longo de todos os períodos de infecção.**

Na avaliação das cargas parasitárias para o período de 24 horas de incubação, observamos uma queda nos números de amastigotas das culturas de macrófagos murinos J774.16 infectadas pelos isolados susceptíveis tanto nas condições controle ( $p=0.016$ ) ou tratadas por L-NMA, quando comparados com os que elas apresentaram no tempo de 4 horas de incubação (**Figuras 7A e 7B**). Essa diminuição dos números de amastigotas não foram observadas para as culturas infectadas pelo isolado resistente a ROS para esse período de infecção (**Figuras 7A e 7B**).

As culturas de macrófagos murinos J774.16 infectadas pelo isolado susceptíveis apresentam no tempo de 48 horas de infecção, apresentaram números de amastigotas compatível ao tempo de 24 horas de infecção. A partir do período de 48 horas de infecção, as culturas de células J774.16 infectadas pelo isolado resistente a ROS já apresentam uma diminuição nos números de amastigotas para ambas condições, sendo essas diferenças significantes. Assim, as culturas controle ( $p=0,140$ ), quanto as incubadas com LMNA apresentaram cargas parasitárias significativamente menores do que as culturas de 24 horas de infecção (**Figuras 7B e 7C**).

As cargas parasitárias das culturas de células J774.16 infectadas tanto pelos isolados susceptíveis quanto pelo resistente a ROS, apresentam números de amastigotas mais baixos no tempo de 72 horas de infecção para qualquer das condições de infecção avaliada (**Figuras 7C e 7D**) quando comparados com os que foram registrados para essas culturas de células J774.16 infectados por esses dois isolados nos tempos anteriores de infecção a saber: 4, 24 e 48 (**Figuras 7A, 7B e 7C**).

### **5.2.2 Avaliação da ação leishmanicida de ROS para as formas amastigotas de *L. (L.) chagasi* em culturas de células J774.16 tratadas com DETC e com o estímulo combinado DETC/NAC.**

Para avaliar a contribuição do ânion superóxido na viabilidade de amastigotas de *L. L. chagasi* susceptíveis e resistente a ROS, incubamos as culturas de macrófagos murinos J774.16 infectadas por esses isolados com DETC (um dos inibidores da SOD-1) e com um estímulo combinado de DETC/NAC a essas culturas, para avaliar se a morte induzida pelo DETC ocorre através de dano oxidativo.

#### **Comparação do número de amastigotas dentro de cada grupo de células infectadas por um isolado específico (resistente ou susceptível a ROS).**

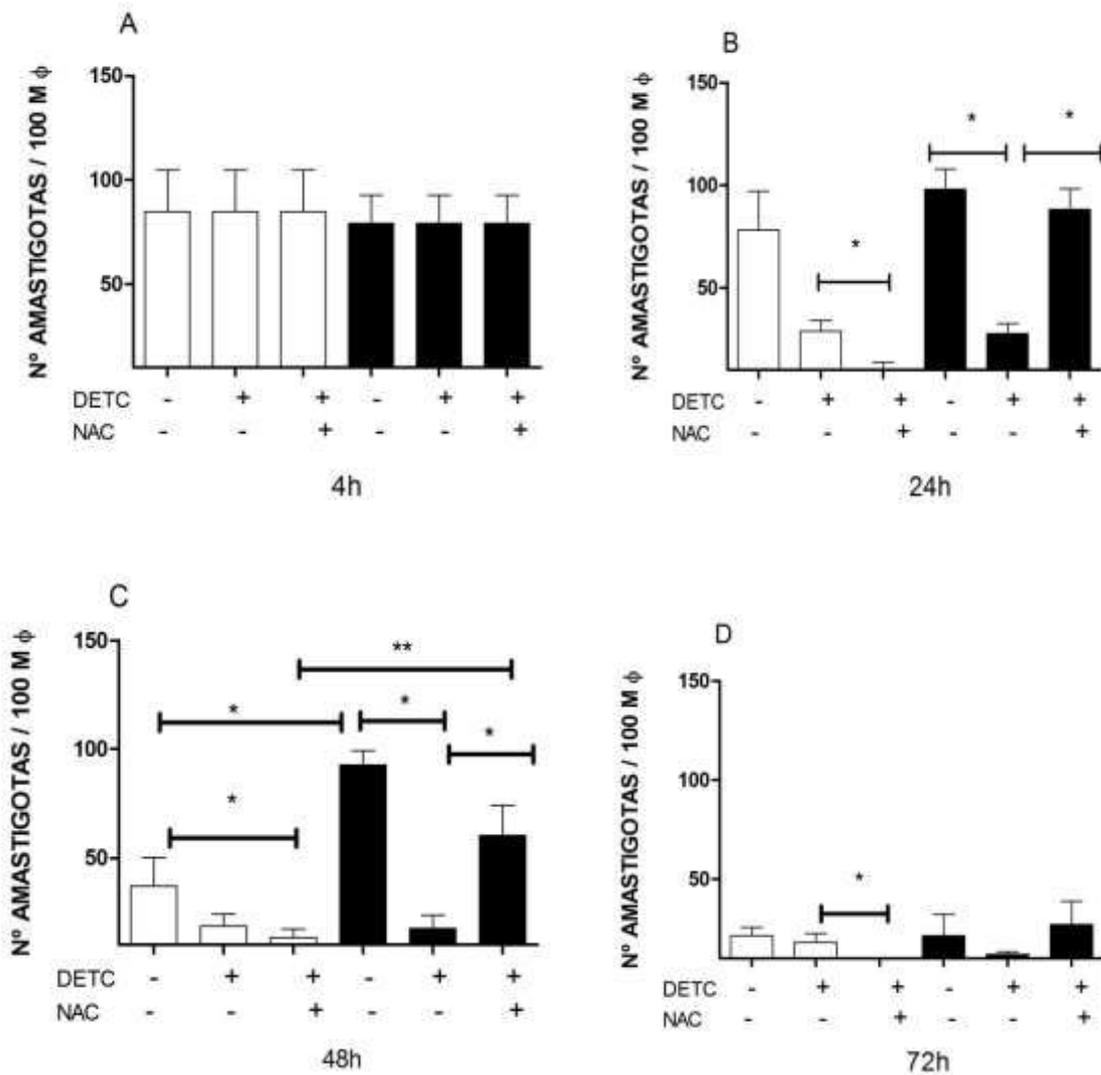
Inicialmente avaliamos a carga parasitária para o período de incubação de 4 horas de infecção, comparando os números de amastigotas do controle com os das culturas infectadas nas condições experimentais (DETC e DETC/NAC), para a cultura de células J774.16 infectada por ambos os isolados, separadamente. Na análise desses dados, observamos que as culturas infectadas pelos isolados susceptíveis a ROS, não apresentaram diferenças significativas nos números de amastigotas de suas respectivas culturas controles comparados com os que foram registrados para as condições experimentais (**Figura 8A**), nem entre as cargas parasitárias dessas duas últimas condições. Resultados semelhantes foram encontrados para os números de amastigotas documentados para as culturas infectadas pelo isolado resistente a ROS, nessas três condições de infecção (**Figura 8A**).

Com relação ao período de 24 horas de infecção, observamos que as culturas de células J774.16 infectadas pelos isolados susceptíveis em condições controle apresentaram números de amastigotas maiores ( $140 \pm 40$ ) do que as culturas que foram tratadas com DETC ( $43 \pm 13$ ), embora essa diferença não tenha sido significativa (**Figura 8B**). Comparando os números de amastigotas entre as culturas infectadas nas condições experimentais (**Figura 8B**), observamos que não houve aumento no número de amastigotas quando da adição de NAC ( $36 \pm 9$ ) a essas culturas. A diferença entre seus números de amastigotas foi significativa,  $p=0,013$  (**Figura 8B**). As culturas controle de J774.16 infectadas pelo isolado resistente a ROS apresentaram números de

amastigotas maiores ( $120 \pm 70$ ) do que os das culturas tratadas com DETC ( $38 \pm 15$ ),  $p = 0.010$  (**Figura 8B**). No entanto, quando essas culturas foram tratadas com NAC ( $100 \pm 58$ ), observamos um aumento nos números de amastigotas, comparáveis com os do controle (**Figura 8B**), sendo essa diferença significativa,  $p = 0.020$  (**Figura 8B**).

Na análise das cargas parasitárias para o tempo de 48 horas de incubação das culturas infectadas pelos isolados susceptíveis a ROS, observamos baixos números de amastigotas nas três condições de infecção (controle, DETC e DETC/NAC), sendo que suas culturas controle apresentaram maiores números de amastigota ( $100 \pm 40$ ) do que as que foram tratadas com DETC ( $45 \pm 8$ ) e DETC/NAC ( $36 \pm 6$ ),  $p = 0,040$  (**Figura 8C**). Nesse período de incubação, não observamos também aumentos nos números de amastigotas das culturas em que foi adicionado NAC (**Figura 8C**). Para as culturas infectadas pelo isolado resistente a ROS, observamos redução das cargas parasitárias no estímulo de DETC ( $36 \pm 10$ ) e aumentos nos números de amastigotas (comparáveis aos do controle) quando essas culturas foram tratadas com NAC ( $100 \pm 50$ ). As diferenças entre as cargas parasitárias das culturas controle ( $106 \pm 46$ ) com as das culturas tratadas com DETC foram significantes,  $p = 0,021$ . Também observamos diferenças significativas,  $p = 0,013$ , entre os números de amastigotas das culturas infectadas nas condições experimentais (DETC e DETC/NAC).

Na análise das cargas parasitárias do tempo de 72 horas de incubação para as culturas de células J774.16 infectadas pelos isolados susceptíveis a ROS, observamos uma redução nos números de amastigotas para as três condições de infecção, não sendo observadas diferenças significativas entre as cargas das culturas controle, comparadas com as condições experimentais ( $40 \pm 24$ ), ( $40 \pm 13$ ), ( $52 \pm 12$ ). Nessa condição também não observamos reversão nos números de amastigotas das culturas tratadas com NAC. Quanto as culturas infectadas pelo isolado resistentes a ROS, observamos que as culturas controle ( $53 \pm 13$ ) apresentam números de amastigotas maiores do que os das culturas tratadas com DETC ( $15 \pm 6$ ) (diferença não significativa). As culturas tratadas com NAC apresentaram números de amastigotas ( $60 \pm 20$ ) comparáveis aos do controle, embora não tenhamos detectado diferença significativa quando comparados com os das culturas tratadas com DETC,  $p = 0.056$  (**Figura 8D**).



**Figura 8:** Infecção de macrófagos murinos J774.16 por *L.(L.) chagasi* susceptíveis (Barra branca) (n=2) e resistente a ROS (n=1) (Barra preta) incubados com DETC ou DETC/NAC. após o tratamento com DETC ou DETC/NAC no período de 4h (7A), 24h (7B), 48h (7C) e 72 horas de infecção (7D). O número de amastigota foi determinado por microscopia óptica a cada 100 macrófagos. Dados são representativos de um experimento representativo de 2 experimentos independentes feito em duplicata de cada isolado. Barras representam média  $\pm$  SD.\*p=0,013; p=0,010; p=0,020; p=0,040; p=0,030; p=0,021; p=0,013; p=0,008 (Teste de Mann Whitney).

## **Avaliação de variação no número de amastigotas ao longo de todos os períodos de infecção.**

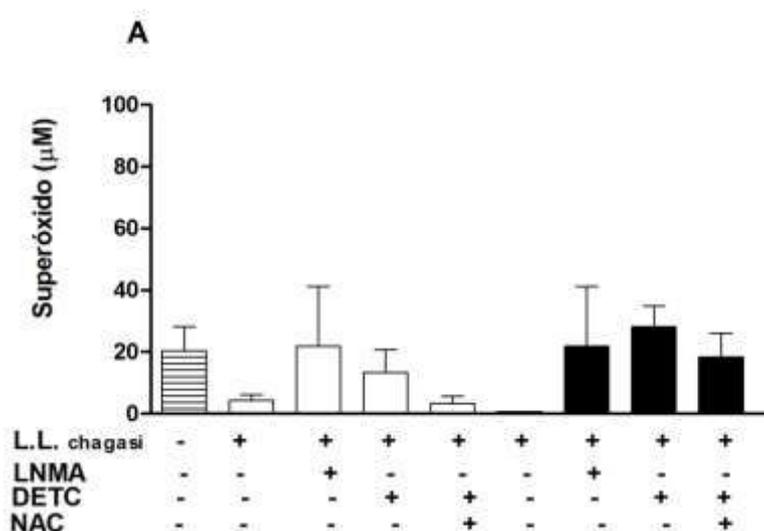
Na análise do período de 24 horas de incubação das culturas infectadas pelos isolados susceptíveis a ROS, observamos números de amastigotas mais baixos para as culturas infectadas nas condições experimentais (DETC e DETC/NAC), mas não nas das culturas controle quando comparados com os que foram documentados para o período de 4 horas de infecção (**Figuras 8A e 8B**). As culturas de células J774.16 infectadas pelo isolado resistente a ROS tratadas com DETC apresentaram também menores números de amastigotas comparados com o registrado no período de 4 horas de incubação para essa mesma condição. No entanto, quando comparamos os números de amastigotas das culturas controles e das que foram tratadas com NAC, não observamos diferença entre esses números para essas culturas infectadas nas mesmas condições para o período de 4 horas de infecção.

Com relação ao período de 48 horas de incubação das culturas infectadas pelos isolados susceptíveis a ROS, observamos números de amastigotas mais baixos para as culturas infectadas nas três condições experimentais (controle, DETC e DETC/NAC), quando comparados com os números registrados por essas culturas no período de 24 horas de infecção (**Figuras 8B e 8C**). Já as culturas de células J774.16 infectadas pelo isolado resistente não apresentam diferenças entre os números de amastigotas das culturas controles e daquelas que foram tratadas com NAC em relação ao tempo de 24 horas de infecção, mas as culturas que foram tratadas com DETC apresentam números de amastigotas menores do que as suas culturas de 24 horas de infecção (**Figuras 8B e 8C**).

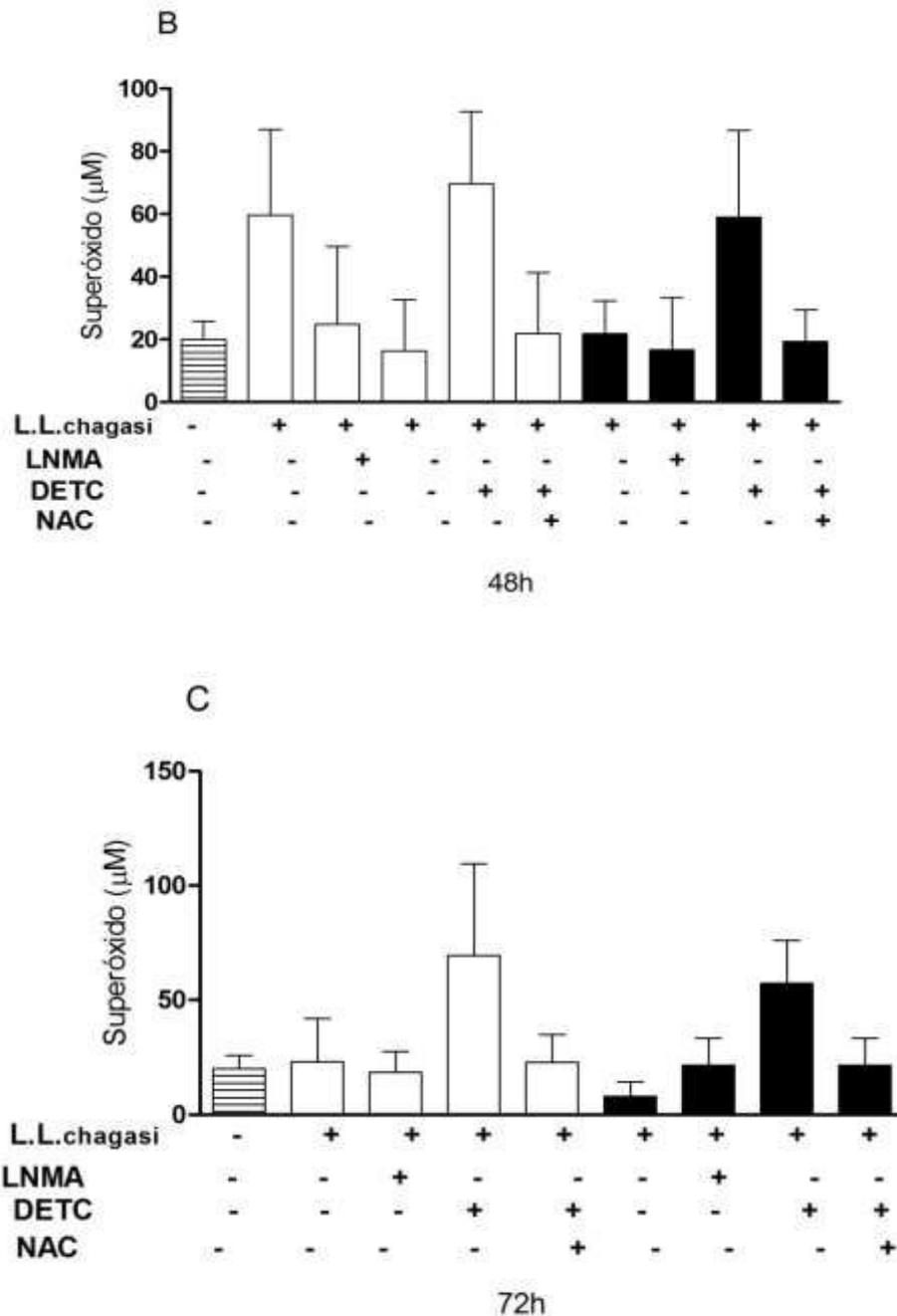
Ambas as culturas de células J774.16 infectadas tanto pelos isolados susceptíveis, quanto pelo isolado resistente a ROS, apresentaram no tempo de 72 horas de infecção números de amastigotas mais baixos quando comparados com os que foram documentados nos períodos de incubação anteriores (4,24 e 48), para todas as condições de infecção (**Figuras 8A, 8B e 8C**).

### 5.3 Avaliação da produção do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) em culturas de células J774.16 infectadas por *L. (L.) chagasi* resistente e susceptíveis a ROS.

A produção do ânion superóxido nas culturas de macrófagos murinos J774.16 infectadas tanto pelos isolados susceptíveis quanto pelo isolado resistente a ROS, não apresentaram diferenças significativas nos níveis desse oxidante produzidos nos diferentes tempos de incubação avaliados a saber, 24, 48 e 72 horas (**Figura 9A, 9B e 9C**). Dessa forma, observamos baixos níveis do ânion superóxido produzidos no tempo de 24 horas de incubação por ambas as culturas de macrófagos murinos J774.16 infectadas pelos isolados susceptíveis e resistente a ROS para todas as condições do experimentos. Embora o tratamento dessas culturas com LMNA e DETC apresente uma maior produção do ânion superóxido, mas essas diferenças não são significantes, quando comparados com os níveis que foram produzidos por seus controles (não infectado e infectados por *L. L. chagasi*) e mesmo para as culturas que foram tratadas com NAC (**Figura 9A**). Com relação ao tempos de incubação de 48 e 72 horas de infecção registra-se um aumento na produção do ânion superóxido para ambas as culturas de macrófagos murinos J774.16 infectadas por esses dois diferentes grupos de isolados quando comparamos com os que foram produzidos no período de 24 horas, mas também aqui não observamos diferenças significativas entre os níveis produzidos desse ânion para as diferentes condições experimentais (**Figuras 9B e 9C**).



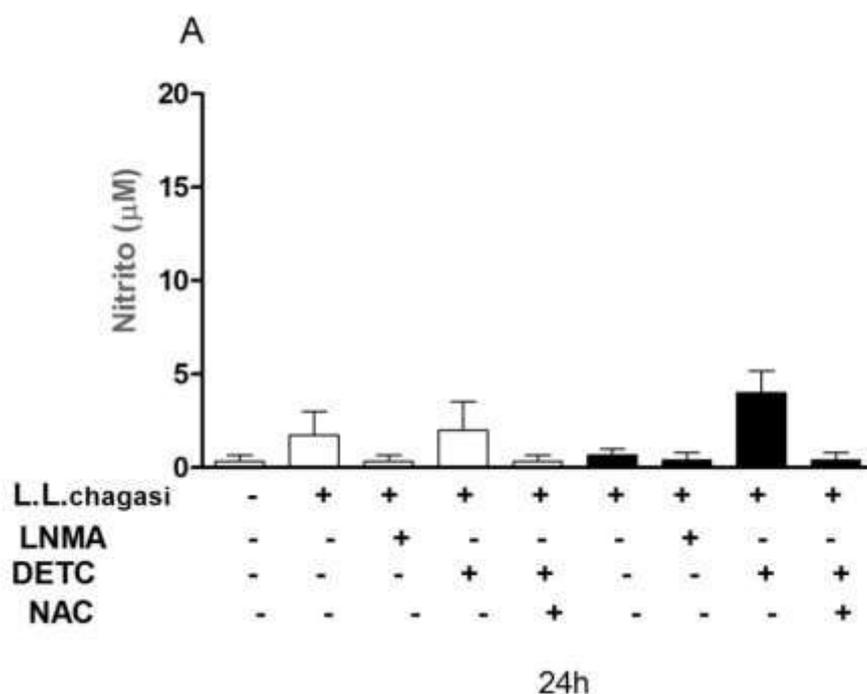
24h

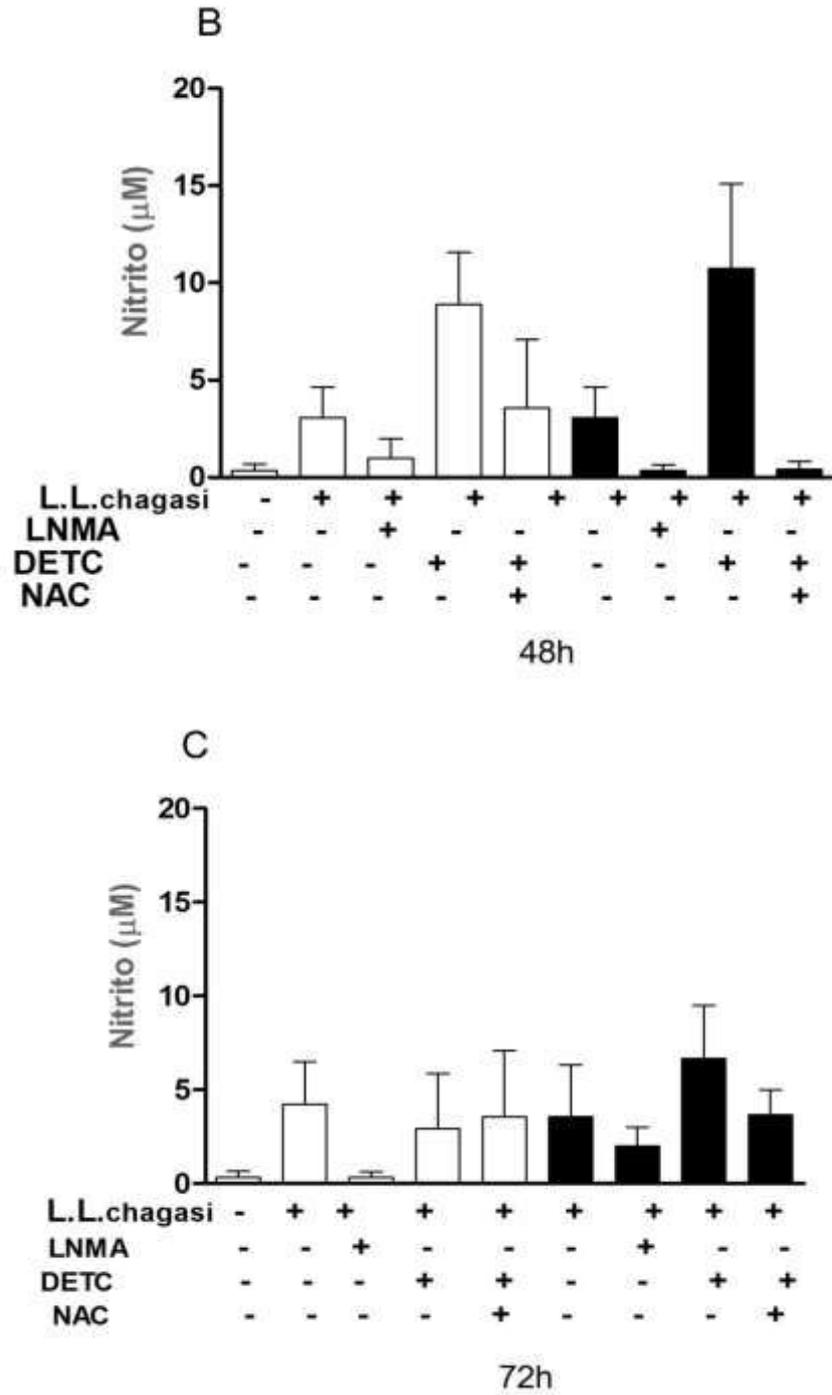


**Figura 9:** Quantificação de ânion superóxido produzido por macrófagos murinos J774.16 durante infecção de *L. (L.) chagasi* susceptível (barra branca) e resistente a ROS (barra preta) tratados com LNMA, DETC, DETC/NAC, após 24h (A), 48h (B) e 72 horas de infecção (C). Dados são representativos de um experimento representativo de 2 experimentos independentes feito em duplicata para cada isolado. Barras representam média  $\pm$  SD.

### 5.5 - Avaliação dos níveis de óxido nítrico (NO) em sobrenadantes de culturas de macrófagos murinos J774.16 infectadas por *L. (L.) chagasi* resistente e susceptíveis a ROS

A produção do óxido nítrico (NO) em sobrenadantes das culturas de macrófagos murinos J774.16 infectadas no período de 24 horas de incubação, tanto pelos isolados susceptíveis quanto pelo isolado resistente a ROS, foi baixa para qualquer dos tratamentos des culturas. Ambas as culturas tratadas tanto com o inibidor de iNOS quanto com NAC apresentaram baixos níveis de NO. Essas diferenças não foram significativas (**Figura 10 A**). Com relação ao tempos de incubação de 48 e 72 horas de infecção registra-se um aumento na produção do óxido nítrico para ambas as culturas de macrófagos murinos J774.16 infectadas por esses dois diferentes grupos de isolados quando comparamos com os que foram produzidos no período de 24 horas, mas também aqui não observamos diferenças significativas entre os níveis produzidos desse oxidante para as diferentes condições experimentais (**Figuras 10B e 10C**).





**Figura 10:** Quantificação de óxido nítrico produzido por macrófagos murinos J774.16 durante infecção de *L. (L.) chagasi* susceptível (barra branca) e resistente a ROS (barra preta) tratados com LPS/IFN $\gamma$ , DETC, DETC/NAC, após 24h (A), 48h (B) e 72 horas de infecção (C). Dados são representativos de um experimento representativo de 2 experimentos independentes feito em duplicata de cada isolado. Barras representam média  $\pm$  SD.

## 6. DISCUSSÃO

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio contribuem para o estresse oxidativo intracelular pelo excesso de radicais promotores de disfunções biológicas, que são altamente reativos e causam danos em lipídios, proteínas, DNA e membranas nuclear e mitocondrial, e estão associados com a atividade antimicrobiana para *Leishmania* (WILSON et al., 2000; MUKBEL et al., 2007; FONSECA-SILVA et al., 2011).

Neste trabalho avaliamos *in vitro* a atividade de ROS sobre promastigotas de *L. (L.) chagasi* através da exposição à menadiona (doador do ânion superóxido), bem como a ação das ROS em macrófagos murinos J774.16 e correlação dos níveis ânion superóxido e do óxido nítrico com a atividade leishmanicida. O aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS), induzida pela utilização da menadiona e pelo peróxido de hidrogênio, altera a função celular em promastigotas de *L. (L.) chagasi* interferindo em sua viabilidade (WILSON et al., 1994).

Nossos dados mostraram que dentre os dezesseis isolados de promastigotas de *L. (L.) chagasi* estudados, dois foram resistentes às ROS, porém a maioria deles apresentaram fenótipos de susceptibilidade. Estes dados foram semelhantes aos pesquisados anteriormente por Gantt e colaboradores (2000). A *Leishmania sp* é capaz de desenvolver mecanismos antioxidantes de defesa das ROS, principalmente através da síntese enzimáticas da superóxido dismutase (SOD), que participam do mecanismo de resistência do parasito (GHOSH et al., 2003; KHOURI et al, 2010; WILSON et al., 1994).

O perfil de viabilidade de isolados de promastigotas de *L. (L.) chagasi* do Estado de Sergipe às espécies reativas de oxigênio, pela exposição à menadiona demonstrou perda de 50% da viabilidade dessas promastigotas a partir de concentrações de 16µM. Neste aspecto, nossos dados diferem do trabalho de Wilson e colaboradores (1994), que observaram perdas de viabilidade de *L. (L.) chagasi* em concentrações bem baixas de menadiona, quando expuseram isolados de promastigotas *L. (L.) chagasi* à menadiona utilizando isolados oriundos do Estado da Bahia (GANTT et al., 2001).

A resistência ao NO pode ainda estar relacionada com fatores de virulência do parasito que modulam esta via bioquímica e resistem aos mecanismos microbicidas dos macrófagos (GUIDICE. et al., 2006). O fenótipo de resistência natural ao NO por

promastigotas de L.(L.) chagasi oriundos de paciente e cães do Estado de Sergipe foi verificado anteriormente por Santos e colaboradores (2012).

Santos (2013), reportou um importante mecanismo natural de resistência cruzada in vitro de promastigotas de L.(L.) chagasi oriundos de paciente do Estado de Sergipe ao óxido nítrico e drogas antimônias trivalente e pentavalente (SB<sup>III</sup> e SB<sup>V</sup>). Esse mecanismo de resistência cruzada sugere maior virulência desses isolados que pode refletir em formas clínicas mais graves, conforme trabalhos de Guidice et al., (2006) e Santos, P. (2011). Contudo, evidenciamos resistência cruzada ao SB<sup>III</sup> / SB<sup>V</sup> e ROS pouco frequente (comunicação oral com SANTOS, M.L. 2013).

Avaliamos a infecção em macrófagos murinos J774.16 durante 4, 24, 48 e 72 horas. O tempo de 4 horas permitiu estimar a capacidade de infecção pelo mecanismo de fagocitose, processo mediado por interações entre as moléculas presentes na membrana de Leishmania com os receptores de membrana do fagócito (MOSSER et al, 2008; KEDZIERSKI et al., 2004). Nossos dados sugerem que culturas de células J774.16 infectadas tanto do isolado resistente quanto pelos susceptíveis a ROS apresentam capacidades infectivas semelhantes, independente das condições experimentais (DETC, DETC/NAC, LNMA) e controle. A infecção inicial de macrófagos é favorecida por proteases do patógeno, principalmente pela LPG e gp63 (ZAMBONI et al, 2012). O parasito pode utilizar receptores para sua internalização no macrófago, tais como CR3, sem ativar mecanismo microbicida importante (ZAMBONI et al, 2012; OLIVIER et al.,).

Ao longo da infecção as amastigotas oriundas de formas resistentes e susceptíveis as ROS, demonstraram padrão de infectividade similares nos ensaios de infecção em macrófagos murinos J774.16. Culturas controles mantiveram número decrescente de ambos isolados resistentes e susceptíveis, com redução de metade de suas cargas parasitárias após 48 horas. Isto sugere que a linhagem J774.16 desencadeia mecanismo microbicida em resposta a infecção, como já demonstrado por Taborda et al., (2006) num modelo de infecção com outro patógeno intracelular.

Verificamos ainda, uma correlação positiva entre a atividade leishmanicida e produção do ânion superóxido, cujos resultados são semelhantes aos achados de BRENNAN et al., (2004). A resistência à leishmaniose visceral é influenciada por mecanismos de respostas microbicidas dos macrófagos, mediante a síntese moléculas tóxicas, tais como o óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (BARRAL NETO et al., 1992).

A resposta imunológica de macrófagos infectados por *Leishmania* apresenta uma relação negativa com a expressão e síntese da superóxido dismutase I (SOD1), cujos níveis de SOD1 são estreitamente regulados por IFN- $\beta$  (KHIOURI et al, 2009; SHROCK et al, 2007). A SOD I é capaz de inibir os níveis de ânion superóxido em macrófagos, e assim reduzem a atividade microbicida em macrófagos infectados com leishmania por ação quelante (KHIOURI et al, 2009). Além disso, os níveis de IFN-  $\beta$  e SODs favorece a exibição de síntese de proteínas de finalização de síntese de citocinas proinflamatórias, as SOCs, inibindo a ativação do macrófago (ZIMBONI et al., 2012).

Nossos resultados mostraram que o DETC, inibidor de superóxido dismutase 1 (SOD1), foi capaz reduzir a carga parasitária dos isolados de L.(L) chagasi, com parâmetros de susceptibilidade principalmente para isolados resistentes a ROS na forma promastigota. Esses resultados são compatíveis a atividade leishmanicida demonstrada anteriormente por Khouri et al., (2010), e confirmam a relevância da SOD1 na viabilidade do parasito no estágio intracelular (MILLER et al., 2004; ASSECHE et al., 2011).

Nossos dados de quantificação de ânion superóxido e óxido nítrico sugerem que a atividade leishmanicida do DETC pode ser induzida pela liberação desses radicais. FONSECA-SILVA et al (2012), evidenciaram *in vitro* o mecanismo leishmanicida envolvendo a participação do ânion superóxido, com alteração importante na mitocôndria do parasito, cuja disfunção nesta organela celular interfere na geração do adenosina trifosfato (ATP) (WILSON et al, 2000; KHOURI et al, 2010).

O efeito antioxidante ao tratamento do DETC pode ser induzido pela adição do N-acetilcisteína (NAC). Assim, durante o tratamento da cultura com DETC/NAC, verificamos efeitos de reversão na replicação de amastigotas oriundas de promastigotas resistentes a ROS comparado aos susceptíveis, nos tempos de 24-48 horas após infecção. O NAC exerce ação antioxidante sobre ROS promovendo redução nos níveis de ânion superóxido e óxido nítrico e conseqüentemente estabelece ambiente propício para replicação da *Leishmania* (NOVAIS, et al., 2009). Este dado sugere que o NAC postula mecanismo de destoxificação para isolados resistentes a ROS.

Por fim, utilizamos um inibidor de iNOS (LNMA) para a investigar o papel da ROS independente da atividade do óxido nítrico, uma vez que essas espécies reativas apresentam ação leishmanicida efetora. Observamos que macrófagos tratados com LNMA apresentaram baixos níveis de óxido nítrico (GANTT et al., 2001). Entretanto, mesmo na presença de baixos níveis de óxido nítrico ambos parasitos conseguiram

manter o controle da infecção. Desta forma, podemos inferir que a ação leishmanicida é induzida por ROS detectados em sobrenadante de macrófagos, resultado semelhante foi demonstrado por Mukbel et al., 2007 para isolados de *Leishmania major*.

O modelo experimental aqui descrito demonstra que promastigotas de *L.(L.) chagasi* evidenciaram fenótipo natural de susceptibilidade e resistência a ROS in vitro, embora quando incubadas em macrófagos murinos J774.16, esses isolados evidenciaram fenótipo de viabilidade similar.

## 7. CONCLUSÕES

1. Espécies reativas do oxigênio exercem ação tóxica em dose dependente para promastigotas de *L.(L.) chagasi*;
2. As promastigotas de *L. (L.) chagasi* foram agrupadas em susceptíveis e resistentes a ROS, sendo que 87% delas são susceptíveis a ROS;
3. O padrão de susceptibilidade e resistência a ROS das promastigotas de *L. L. chagasi* foi observado para respectivas formas amastigotas;
4. Os efeitos tóxicos induzidos por DETC sobre amastigotas de *L.L chagasi* é revertido por adição de um antioxidante, N-acetilcisteína, em amastigotas do isolado resistente;
5. A ação leishmanicida da linhagem de macrófagos murinos J774.16 para as amastigotas de *L. L.chagasi* é dependente de espécies reativas do oxigênio;

## REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, J. BROMBACHER, F. T helper1/T cell and resistances/susceptibility to Leishmania infection: is this paradigm still relevant? **Imunology**. 2012
- ASSCHE, T.V., M. DESCHACHT, R. LUZ, LOUIS MAES, PAUL. Leishmania-macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Elsevier**.2011
- AWASTHI, A., MATHUR, R.K., SAHA, B. Immune response to Leishmania infection. **Indian J Med Res**. v.119, p.238-258. 2004.
- BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med**. v. 109, p. 33-44, 2000.
- BATES PA, ROGERS ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. **Curr Mol Med**. 2004; 4(6): 601-609.
- BACELLAR, O. E. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. . **Gazeta Médica da Bahia**, v.75, p.24-34. 2005.
- BARRAL-NETTO, M.;BARRAL, A.;BROWNELL, C. E.;SKEIKY, Y. A.;ELLINGSWORTH, L. R.;TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**, v.257, n.5069, Jul 24, p.545-8. 1992
- CASTILHO, T.M. ; GOLDSMIT, P.; Murine model of chronic L. (Viannia) panamensis infection role of IL-13 in disease. **Jornal Imunology**. 2010
- CUMMINGHAM, A.C.; SMOOFF, E.; Parasitic adaptive mechanism in infection by leishman. **Exp. Mol. Pathology**. 2010
- DESJEUX P. The increase of risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans. R. **Soc. Trop. Med. Hyg**. 2001; 95: 239-243.
- CRUZ, K.K., S. G. FONSECA, M. C. MONTEIRO, O. S. SILVA, V. M. ANDRADE, F. Q. CUNHA & P. R. T. ROMÃO. The influence of glutathione modulators on the course of Leishmania major infection in susceptible and resistant mice. 2010
- CHAGAS, M.M., MONTEIRO & FÚLVIA C. S. M. & DARELA BLAZIUS & ONILDA SANTOS DA SILVA & FERNANDO DE QUEIROZ CUNHA & DIANA BITTENCOURT BENTO & PEDRO ROOSEVELT TORRES ROMÃO. N-acetyl-L-cysteine reduces the parasitism of BALB/c mice infected with Leishmania amazonenses. **Parasite Immunology**.2008

CHAPPUIS, F.;SUNDAR, S.;HAILU, A.;GHALIB, H.;RIJAL, S.;PEELING, R. W.;ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**, v.5, n.11, Nov, p.873-82. 2007.

DAS M, MUKHERJEE SB AND SHAHA C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Journal of Cell Science**. 2001

DEY, R.;SARKAR, A.;MAJUMDER, N.;BHATTACHARYYA MAJUMDAR, S.;ROYCHOUDHURY, K.;BHATTACHARYYA, S.;ROY, S.; MAJUMDAR, S. Regulation of impaired protein kinase C signaling by chemokines in murine macrophages during visceral leishmaniasis. **Infect Immun**, v.73, n.12, Dec, p.8334-44. 2005.

DIAS COSTA, J.;DE NAZARETH MEIRELLES, M.;EDUARDO PEREIRA VELLOSO, C.; PORROZZI, R. *Leishmania chagasi*: cytotoxic effect of infected macrophages on parenchymal liver cells. **Exp Parasitol**, v.117, n.4, Dec, p.390-8. 2007.

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Microbiol Infect Dis**. 2004;. 27(5): 305-18.

DESJEUX P. The increase of risk factors for leishmaniasis world wide. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg** 2001; 95: 239-243.

DOMINGUEZ M, MORENO I, AIZPURUA C, TORANO A. Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. **Microbes and Infection**, 2003

FOLLADOR, I., ARAUJO, C., BACELLAR, O., ARAUJO, C. B., CARVALHO, L. P., ALMEIDA, R. P. et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. **Clin Infect Dis**, v.34, p.54-58. 2002.

FARIA, D. R., K. J. GOLLOB, et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infect Immunology**. v.73, n.12, Dec, p.7853-9. 2005.

FONSECA-SILVA, F.; INACIO, J.D.F.; CANTO-CAVALHEIRO, M.C.; ALMEIDA-AMARAL, E.E.; Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. **Plos One**. 2011

GONTIJO B, DE CARVALHO MLR. American cutaneous leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop** . 36(1): 71-80. 2003

GANTT, K. R.;GOLDMAN, T. L.;MCCORMICK, M. L.;MILLER, M. A.;JERONIMO, S. M.;NASCIMENTO, E. T.;BRITIGAN, B. E.; WILSON, M. E. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **J. Immunology**, v.167, n.2, Jul 15, p.893-901. 2001.

GANTT, K. R.;SCHULTZ-CHERRY, S.;RODRIGUEZ, N.;JERONIMO, S. M.;NASCIMENTO, E. T.;GOLDMAN, T. L.;RECKER, T. J.;MILLER, M. A.; WILSON, M. E. Activation of TGF-beta by Leishmania chagasi: importance for parasite survival in macrophages. **J Immunol**, v.170, n.5, Mar 1, p.2613-20. 2003.

GIUDICE, A., I. CAMADA, et al. Resistance of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (Viannia) braziliensis to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infect Dis**, v.7, p.7. 2007.

GHOSH, S., GOSWAMI,S. ADHYA. Role of superoxide dismutase in survival of Leishmania within the macrophage **Elsevier**.2003

GONTIJO, C.M.F., MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. bras. epidemiol.** v.7, p.338-349, 2004.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, v. 3, p. 23–35, 2003.

HEART, E.; PALO, M.; WOMACK,TRACE.; The level of menadione redox – cycling in pancreatic  $\beta$  cell is proportional to the glucose concentration : role of NADH and consequences for insulin secretion. **Toxicol. Pharmacology**. 2011

HEINZEL, F. P., M. D. SADICK, et al. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.88, n.16, Aug 15, p.7011-5. 1991.

HORTA, M.A.,et al. Reactive species oxygen and nitric oxide in cutaneous Leishmaniasis. **Elsevier**. 2011

HOLZMULLER, P., D. SERENO, et al. Lower nitric oxide susceptibility of trivalent antimonyresistant amastigotes of Leishmania infantum. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49,n.10, Oct, p.4406-9. 2005.

JERONIMO, S. M., P. DUGGAL, **et al**. Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan Leishmania chagasi: a genomewide scan. **J Infect Dis**, v.196, n.8, Oct 15, p.1261-9. 2007.

KROPF, P., FREUDENBERG, M. A., MODOLELL, M., PRICE, H. P., HERATH, S., ANTONIAZI, S., GALANOS, C., SMITH, D. F., MULLER, I. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite Leishmania major. **Infect. Immun.** p. 721920-1928, 2004.

KILLICK-KENDRICK R, RIOUX JA. Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of Leishmania infantum in Phlebotomus ariasi. **Parasitologia**. 2002; 44(1-2): 67-71.

KHOURI R, NOVAIS F, SANTANA G, DE OLIVEIRA CI, VANNIER DOS SANTOS MA, BARRAL A, BARRAL-NETTO M, VAN WEYENBERGH J. DETC induces Leishmania parasites killing in human in vitro and murine in vivo models: A promising therapeutic alternative in leishmaniasis. **Plos One**, 2010

KHOURI,R.; BAFICA, A.; NORONHA, M.;PIERRE , J.; et al . IFN- $\gamma$  Impairs Superoxide-Dependent Parasite Killing in Human Macrophages: Evidence for a Deleterious Role of SOD1 in Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**. 2009

KAYE, P. e SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host pathogen interface. **Natur. Microbiol.** 2011

KUMAR e NYLEN. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontier Immunology**. 2012

LEOPOLDO, P. T., P. R. MACHADO, et al. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. **BMC Infect Dis**, v.6, p.75. 2006.

LANSON., D.; PLZA, S. The anticancer effects of vitamin K. **Medicine**.2003

LATZ, E.;VISINTIN, A.;LIEN, E.;FITZGERALD, K. A.;MONKS, B. G.;KURT-JONES, E. A.;GOLENBOCK, D. T.; ESPEVIK, T. Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. **J Biol Chem**, v.277, n.49, Dec 6, p.47834-43. 2002.

LUKES, J., MAURICIO, I.L., SHONIAN, G., DUJARDIN, J.C., SOTERIADOU, K., DEDET, J.P. et al., Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **PNAS**. v.104, p.9375–9380. 2007.

MAGILL, A. Leishmaniasis. In: Strickland, G. (Ed.), *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. Saunders, Philadelphia, p. 665–688, 2000.

MANTOVANI, A., SICA, A., LOCATI, M. Macrophage polarization comes of age. **Immunity**, v. 23, p. 344–346, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 8ª edição. Brasília / DF, 2010.

\_\_\_\_\_Manual de Controle da Leishmaniose, 2010.

\_\_\_\_\_Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília. 2005.

MAURICIO, I.L., STOTHARD, J.R., MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**, v. 16, p. 188-189, 2000.

MOZAFFARIANI, N.; BERMAN, J.; CASADEVALLI.; Immune complexes increase nitric oxide production by interferon- $\gamma$ -stimulated murine macrophage-like J774.16 cells. **Journal of Leukocyte Biology** . 1995

MURRAY, H. W. E C. F. NATHAN. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **J Exp Med**, v.189, n.4, Feb 15, p.741-6. 1999.

MURRAY, H.W., BERMAN, J.D., DAVIES, C.R., SARAVIDA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**. v.4, p.1561-1577. 2005.

MUKBEL, R. M., PATTEN, JR. C., GIBSON, K., GHOSH, M., PETERSEN, C., JONES, D. E. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 76, p. 669–675, 2007.

MUKHERJEE, A., ROY, G., GUIMOND, C., OUELLETTE, M. The gamma-glutamylcysteine synthetase gene of *Leishmania* is essential and involved in response to oxidants. **Mol. Microbiol.** v. 74, p. 914–927, 2009.

MILLER, M.A.; GANTT, K.; WILSON, M.E.; Inducible Resistance to oxidant stress in the protozoan *leishmania chagasi*. **Jornal Biology Chesmetry**. 2000

NATHAN, C. & SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proc Natl Acad Sci**. v.97, p.8841-8848. 2000.

NYLÉN, S., SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **TRENDS in Immunology**, v. 28, n. 9, 2007

OLIVIER, M. ; ATAYDE, V., ISNARD,A.; HASSANI, K.; SHIO, M.T.; *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. **Elsevier**. 2012

PARAMCHUK WJ, ISMAIL SO, BHATIA A, GEDAMU L. CLONING, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.** 90, 203-221.1997

PETERSON, R.A.; Regulatory T cell diverse phenotype intergral to immune and homeostasis suppression. **Toxicology Pathol.** 2012

PITTA, M G, ROMANO, A., CABANTOUS, S., HENRI S., HAMMAD, A, KOURIBA B, ARGIRO L., EL KHEIR M, BUCHETON B., MARY C, EL-SAFI SH, DESSEIN A.IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **J Clin Invest Aug**;119(8):2379-87, 2009.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. 2011.

PARAMCHUK WJ, ISMAIL SO, BHATIA A, GEDAMU L. CLONING, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.** 90, 203-221.1997

SHROCK, R. M. R., J. SHROCK, S. APPACHI, R. A. RUDICK, B. R. WILLIAMS, R. M. RANSOHOFF. Novel interferon gamma induced gene expression in peripheral blood cells. **J. Leukocyte Biol.** 82: 1353–1360. 2007.

SILVESTRE, R., SILVA, A.M., CORDEIRO-DA-SILVA, A., OUAISSI, A. The contribution of Toll-like receptor 2 to the innate recognition of a *Leishmania infantum* silent information regulator 2 protein. **Immunol**, v. 128, p. 484-499, 2009.

STUART, K., R. BRUN, et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J. Clin Invest**, v.118, n.4, Apr, p.1301-10. 2008.

SALDANHA, R. R. Influência do tratamento com N-metil-glucamina sobre a fagocitose, a produção de radicais de oxigênio e de nitrogênio e a produção de FNT $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 por fagócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e de camundongos infectados experimentalmente com *Leishmania amazonensis*. Tese. Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

SANTOS, P. L. Avaliação da viabilidade de isolados de *Leishmania chagasi* ao óxido nítrico e associação com a infectividade e a nitratação proteica. Dissertação. Universidade Federal de Sergipe. Aracaju. 2011

SANTOS, P.L.; COSTA, R.V.; BRAZ, J.M.; SANTOS L.F., BATISTA A.C., C.R.O. VASCONCELOS C.R.O.; RANGEL M.R.; RIBEIRO DE JESUS A.; MOURA T.R.; LEOPOLDO P.T.G.; ALMEIDA, R .P. *Leishmania chagasi* naturally resistant to nitric oxide isolated from humans and dogs with visceral leishmaniasis. **Elsevier**. 2012

SANTOS, M. L. Caracterização fenotípica de isolados de *Leishmania chagasi* naturalmente resistentes ao antimonial. Dissertação. Universidade Federal de Sergipe. Aracaju. 2013

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Ministério da Saúde**. 2011.

RANGEL, E. F. & LAINSON. Ecology of the Leishmaniasis. Rio Janeiro. **Fio Cruz**. 2003.

SACKS, D., NOBEN-TRAUTH , N. et al. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**. v.2, p.845-858. 2002.

ROGERS M.E, CHANCE ML, BATES P.A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology** 2001; 124(5): 495-507.

RITTER, U., J. MATTNER, et al. The control of *Leishmania (Leishmania) major* by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. **Microbes Infect**, v.6, n.6, May, p.559-65. 2004.

TABORDA, C. P. ; SILVA ; BARBOSA, J.M.; MARQUES, A. F. ; CASADEVALL A. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. **Elsevier**. 2006

TURRENS J.F. et al. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol**. 552:335-44. 2003.

TURRENS J. F. et al. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Mol. Aspects of Medicine**. 2004

ZAMBONI, D.; FARIA, M.; REIS, F. C. G. ; LIMA, A. P. C. A. ; Toll-Like Receptors in *Leishmania* Infections: Guardians or Promoters? **Journal of Parasitology**. 2012

WANASEN, N., MACLEOD, C. L., ELLIES, L. G., SOONG, L., L-Arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages. **Infection and Immunity**. v.75, p.2802-2810. 2007.

WILSON, M .E; KURT A. ANDERSEN, BRADLEY E. B. Response of *Leishmania chagasi* Promastigotes to Oxidant Stress. **Infection and immunity**, Iowa .Nov. 1994

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva. 2010