



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CÁRCIA SANTANA PASSOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE
MACRÓFAGOS ISOLADOS DE INDIVÍDUOS TRATADOS E
ASSINTOMÁTICOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL**

ARACAJU

2012

CÁRCIA SANTANA PASSOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE
MACRÓFAGOS ISOLADOS DE INDIVÍDUOS
TRATADOS E ASSINTOMÁTICOS PARA
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida

ARACAJU

2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

P289a Passos, Cárcia Santana
Avaliação da atividade leishmanicida de macrófagos isolados
de indivíduos tratados e assintomáticos para leishmaniose visceral
/ Cárcia Santana Passos. – Aracaju, 2012.
00 f. : il.

Orientador (a): Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade
Federal de Sergipe, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa,
Núcleo de Pós-Graduação em Medicina.

1. Leishmaniose visceral 2. Calazar 3. Leishmania chagasi -
Infecção 4. Imunologia 5. Clínica médica I. Título

CDU 616.993.161

CÁRCIA SANTANA PASSOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE MACRÓFAGOS ISOLADOS DE INDIVÍDUOS TRATADOS E ASSINTOMÁTICOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

1º Examinador: Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida

2º Examinador: Prof.^a Dr.^a Valéria de Matos Borges

3º Examinador: Prof.^a Dr.^a Tatiana Rodrigues de Moura

PARECER

[illegible]

Aos meus pais, Everaldo e Carmem, bases da minha educação. Ao meu irmão, Everaldo Filho, e às minhas tias, Lucenira e Luzia, fontes de inspiração. Ao meu esposo, Helder, pelo incentivo e apoio emocional tão necessários para a concretização deste estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Roque Pacheco de Almeida, exemplo de orientador. Sempre paciente e participativo. Obrigada por ter me acolhido na sua equipe e por confiar no meu trabalho.

À Dr.^a Amélia Ribeiro de Jesus, exemplo de sabedoria. Obrigada pelas preciosas sugestões durante todas as etapas.

À Dr.^a Tatiana Rodrigues de Moura, exemplo de companheirismo. Obrigada por me guiar durante toda a pesquisa. Sua presença foi fundamental no desenvolvimento deste estudo.

Ao Dr. Paulo Leopoldo, exemplo de amizade. Obrigada pelas críticas construtivas e pelos momentos divertidos.

A minha amiga Priscila, exemplo de dedicação. Obrigada por poder contar com a sua ajuda nos momentos em que mais precisei.

Aos meus colegas e amigos do laboratório que fizeram deste um ambiente familiar e que mostraram o quanto é importante trabalhar em equipe. Obrigada pela animada e pacífica convivência: Cândida, Fabrícia, Micheli, Ricardo, Sueli, Luana, Fábio, Danilo, Marise, Cecília, Daniela.

A toda equipe do laboratório de Análises Clínicas, especialmente a Flávia, por ter me acolhido e disponibilizado seus equipamentos.

Aos principais colaboradores desta pesquisa, os pacientes, que se disponibilizaram e confiaram no nosso trabalho. Espero que minha humilde contribuição seja útil na busca do conhecimento da Leishmaniose visceral.

A todos aqueles que direta ou indiretamente participaram do desenvolvimento deste trabalho, o meu agradecimento.

RESUMO

Avaliação da atividade leishmanicida de macrófagos isolados de indivíduos tratados e assintomáticos para Leishmaniose visceral, CÁRCIA SANTANA PASSOS, Aracaju, 2012.

As leishmanioses são um grave problema de saúde pública no mundo, demandando medidas eficazes no seu controle e tratamento. A leishmaniose visceral é a forma mais grave e pode ser letal, caso não seja tratada. A depender da interação entre o parasita e a resposta imune do hospedeiro, podem-se desenvolver diferentes manifestações clínicas: forma assintomática, oligossintomática e sintomática. Os macrófagos desempenham um papel fundamental na resposta imune. Entretanto, suas atividades leishmanicidas podem estar prejudicadas, levando à sobrevivência e proliferação dos parasitas no seu interior. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a atividade leishmanicida de macrófagos infectados por *Leishmania chagasi* isolados de indivíduos tratados e assintomáticos para Leishmaniose visceral. A nossa hipótese era que macrófagos isolados de indivíduos tratados eram mais susceptíveis à infecção por *Leishmania chagasi* em relação aos de pacientes assintomáticos. A partir de um estudo transversal, foram investigados 05 indivíduos tratados e 02 assintomáticos do Hospital Universitário. Células mononucleares do sangue periférico foram isoladas dos 07 pacientes para obtenção de monócitos e posterior diferenciação em macrófagos. Estes foram infectados com o isolado LVHSE-07 de *L. chagasi* durante 2, 72 e 96 horas em condições sem e com estímulo de LPS e IFN- γ . Para analisar se os macrófagos respondiam de maneira diferenciada com a *Leishmania* do próprio indivíduo tratado, foram reconvocados 03 tratados e 02 assintomáticos para infectar seus macrófagos com as Leishmanias dos tratados (LVHSE-24, LVHSE-28, LVHSE-37). A resposta leishmanicida dos macrófagos foi analisada determinando-se o percentual de macrófagos infectados e o número de amastigotas no interior dos macrófagos. Os resultados sugerem que os macrófagos dos indivíduos tratados foram mais infectados, principalmente quando utilizada a *Leishmania* do próprio indivíduo, e não controlaram a infecção mesmo na presença do estímulo, ao contrário dos macrófagos dos assintomáticos que sugerem um controle da infecção independente da *Leishmania* utilizada. Este estudo mostrou que macrófagos de indivíduos tratados são mais susceptíveis à infecção por *Leishmania chagasi* quando comparados com macrófagos de pacientes assintomáticos; macrófagos indivíduos tratados são mais infectados com seus próprios isolados de *L. chagasi*; macrófagos de pacientes assintomáticos são menos infectados por *L. chagasi* e apresentam uma carga parasitária menor que os macrófagos de indivíduos tratados independente do isolado de *Leishmania* utilizado na infecção. Conclui-se que os macrófagos estão relacionados com a susceptibilidade ou resistência à infecção por *Leishmania chagasi*.

Palavras-chave: leishmaniose visceral humana; ativação de macrófagos; indivíduos tratados; assintomáticos.

ABSTRACT

Evaluation of leishmanicidal activity of macrophages isolated from treated and asymptomatic visceral leishmaniasis subjects, CÁRCIA SANTANA PASSOS, Aracaju, 2012.

Leishmaniasis is a serious public health problem worldwide, requiring effective measures for its control and treatment. Visceral leishmaniasis is the most severe form and has a lethal potential. Depending on the interaction between the parasite and the host immune response, different clinical manifestations may develop: asymptomatic, oligosymptomatic and symptomatic. Macrophages play a central role in immune response. However, their microbicidal activity may be impaired, leading to the survival and proliferation of the parasites inside them. The objective of this study was to evaluate the leishmanicidal activity of macrophages isolated from treated and asymptomatic visceral leishmaniasis subjects after infection by *Leishmania chagasi*. Our hypothesis was that macrophages isolated from treated subjects were more susceptible to infection by *Leishmania chagasi* in relation to asymptomatic patients. From a cross-sectional study, 05 symptomatic patients and 02 asymptomatic were investigated at University Hospital. Mononuclear cells were isolated from peripheral blood of 07 patients in order to obtain monocytes and further differentiation into macrophages. These were infected with the isolated LVHSE-07 from *L. chagasi* for 2, 72 and 96 hours in conditions with and without stimulus of LPS and IFN- γ . To examine whether macrophages responded differently to the symptomatic patient's own *Leishmania*, 03 symptomatic and 02 asymptomatic patients were reconvened, so that their macrophages would be infected with *Leishmania* from symptomatic patients (LVHSE-24, LVHSE-28, LVHSE-37). Leishmanicide response of macrophages was assessed by determining the percentage of infected macrophages and the number of amastigotes inside macrophages. The results suggest that the macrophages of the symptomatic patients were more infected, especially when used patient's own *Leishmania*, and they did not control infection, even in the presence of stimulus, unlike asymptomatic's macrophages, which controlled infection, independently of what *Leishmania* was used. This study demonstrated that macrophages from symptomatic patients are more susceptible to infection by *Leishmania chagasi*, when compared with macrophages from asymptomatic patients; macrophages from symptomatic patients are more infected with their own isolated of *L. chagasi*; macrophages from asymptomatic patients are less infected with *L. chagasi* and have a parasitic load lower than the macrophages of symptomatic patients, regardless of the *Leishmania* isolated used in infection. It follows that macrophages are related to susceptibility or resistance to infection by *Leishmania chagasi*.

Keywords: human visceral leishmaniasis; macrophage activation; treated subjects; asymptomatic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas clínicas das leishmanioses	15
Figura 2. Distribuição geográfica da Leishmaniose visceral no Velho e Novo Mundo	17
Figura 3. Ciclo biológico da <i>Leishmania donovani</i>	19
Figura 4. Mecanismo imunológico no curso da infecção por <i>Leishmania</i>	22
Figura 5. Infecção de macrófagos de pacientes sintomáticos e assintomáticos com o isolado LVHSE-07 – percentual de macrófagos infectados	35
Figura 6. Infecção de macrófagos de pacientes sintomáticos e assintomáticos com isolado LVHSE-07 – número de amastigotas em 100 macrófagos	36
Figura 7. Infecção de macrófagos de pacientes sintomáticos com seus próprios isolados de <i>Leishmania chagasi</i> (LVHSE-24, LVHSE-28 ou LVHSE-37) e com a <i>Leishmania</i> LVHSE-07 – percentual de macrófagos infectados	38
Figura 8. Infecção de macrófagos de pacientes sintomáticos com seus próprios isolados de <i>Leishmania chagasi</i> (LVHSE-24, LVHSE-28 ou LVHSE-37) e com a <i>Leishmania</i> LVHSE-07 – número de amastigotas em 100 macrófagos	39
Figura 9. Infecção de macrófagos de pacientes sintomáticos e assintomáticos com o isolado de <i>Leishmania chagasi</i> do próprio sintomático (LVHSE-28, LVHSE-37) – percentual de macrófagos infectados	40
Figura 10. Infecção de macrófagos de pacientes sintomáticos e assintomáticos com o isolado de <i>Leishmania chagasi</i> do próprio sintomático (LVHSE-28, LVHSE-37) – número de amastigotas em 100 macrófagos	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização dos pacientes sintomáticos e assintomáticos segundo dados clínicos	34
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CMSP – Células mononucleares do sangue periférico
CR – Receptor do complemento
GM-CSF – Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
Gp63 – Glicoproteína 63
IFN – Interferon
IL – Interleucina
iNOS – Óxido nítrico sintase induzida
LPG - Lipofosfoglicano
LPS – Lipopolissacarídeo
LV – Leishmaniose visceral
LVHSE – Leishmaniose visceral humana de Sergipe
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
MIF – Fator inibitório da imigração
NADPH – Nicotidamina-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio
NK – Natural killer
NO – Óxido nítrico
ROS – Espécies reativas do oxigênio
TCD4+ - Células T apresentando a molécula CD4 na membrana celular
TCD8+ - Células T apresentando a molécula CD8 na membrana celular
TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF – Fator de transformação de crescimento
Th1 – T helper tipo 1
Th2 – T helper tipo 2
TLR - Receptor toll-like
TNF - Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Leishmanioses	15
2.2 Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral	16
2.3 Ciclo Biológico	18
2.4 A Doença no Homem	20
2.5 Resposta Imunológica contra a <i>Leishmania</i>	21
2.5.1 Resposta Imune Adaptativa na Leishmaniose Visceral	21
2.5.2 Resposta Imune Inata na Leishmaniose Visceral	24
2.5.2.1 Sistema Complemento	24
2.5.2.2 Neutrófilos	24
2.5.2.3 Células “Natural Killer”	25
2.5.2.4 Inflamassomas e Receptores Toll-Like	25
2.5.2.5 Infecção de Macrófagos e Mecanismos Microbicidas	27
3 OBJETIVOS	30
3.1 Geral	30
3.2 Específicos	30
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	31
4.1 Esquema do Estudo	31
4.2 Seleção de Pacientes	31
4.3 Cultura de <i>L.chagasi</i>	32
4.4 Isolamento de Monócitos do Sangue Periférico	32
4.5 Infecção de Macrófagos	33
4.6 Considerações Éticas	33
4.7 Análise Estatística	33
5 RESULTADOS	34
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

As Leishmanioses consistem de três principais formas clínicas: leishmaniose cutânea, leishmaniose muco-cutânea e leishmaniose visceral (ASSCHE et al., 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde, são consideradas um importante problema de saúde pública mundial; 350 milhões de pessoas encontram-se em risco de contrair leishmaniose e cerca de 2 milhões de novos casos ocorrem anualmente (WHO, 2010). As leishmanioses são endêmicas em 88 países, dentre os quais 22 pertencem ao Novo Mundo e 66 ao Velho Mundo (ASSCHE et al., 2011).

A leishmaniose visceral (LV) é considerada a forma mais grave e pode ser letal, caso não seja atendida e diagnosticada rapidamente, seguida de tratamento cuidadoso e criterioso. A depender da virulência do parasita, da resposta imune do hospedeiro e, principalmente, da interação entre elas, o indivíduo pode desenvolver diferentes manifestações clínicas da LV que são classificadas em três tipos: forma assintomática, oligossintomática e sintomática (BADARÓ et al., 1986a).

Infecções assintomáticas são comuns em indivíduos resistentes com maior resposta imune do tipo Th1 (linfócito T-helper 1), que favorece a ativação de macrófagos, produção de óxido nítrico, matando os parasitas (CUNNINGHAM, 2002). Enquanto que infecções sintomáticas estão presentes em indivíduos susceptíveis com maior resposta imune tipo Th2 (linfócito T-helper 2), caracterizada pela alta detecção de interleucina-10 (IL-10), que está associada com a proliferação do parasita e a severidade da doença (BADARÓ et al., 1986a; BADARÓ et al., 1986b; GAMA et al., 2004; HOLADAY et al., 1993; JERONIMO et al., 2000).

Os macrófagos desempenham um papel fundamental na resposta imune e todas as espécies de *Leishmania* os parasitam (ALEXANDER & RUSSEL, 1992). Espelhando-se na nomenclatura Th1/Th2, os macrófagos são classificados como células M1 e M2, de acordo com produção de citocinas e marcadores de superfície. Macrófagos do tipo M1 são induzidos por IFN- γ somente ou em conjunto com estímulos microbianos como o Lipopolissacarídeo (LPS), ou citocinas como TNF e GM-CSF. Células M1 possuem o fenótipo de produzirem concentrações elevadas de IL-12 e IL-23, e baixas concentrações de IL-10. São hábeis produtoras de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, além de citocinas inflamatórias (IL-

1 β , TNF e IL-6), sendo resistentes contra parasitas intracelulares (GORDON, 2003; MANTOVANI et al., 2005).

Em contraste, a forma alternativa M2 da ativação do macrófago é resultante da exposição celular às interleucinas IL-4, IL-13 e/ou IL-10, imunocomplexos (GORDON, 2003; MANTOVANI et al., 2005). A forma M2 possui o fenótipo de baixa produção de IL-12 e IL-23 (MANTOVANI et al., 2005). Estudo realizado por Farrow et al. (2011) sugere que as *Leishmanias* se propagam preferencialmente dentro de macrófagos do tipo M2 por serem mais propensos à infecção.

É importante entender os fatores que predispõem alguns indivíduos a manifestar a doença ou o controle da infecção para o desenvolvimento de uma imunoterapia e/ou imunoprevenção. Sendo assim, a nossa hipótese é que macrófagos provenientes de indivíduos tratados são mais susceptíveis à infecção *in vitro* por *Leishmania chagasi* em relação aos de pacientes assintomáticos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças negligenciadas que afetam largamente os países mais pobres, principalmente os em desenvolvimento; 350 milhões de pessoas são consideradas em risco de contrair leishmaniose, e cerca de 2 milhões de novos casos ocorrem anualmente (WHO, 2010).

Consistem de três principais formas clínicas: leishmaniose cutânea; leishmaniose muco-cutânea e leishmaniose visceral (Figura 1) (ASSCHE et al., 2011).

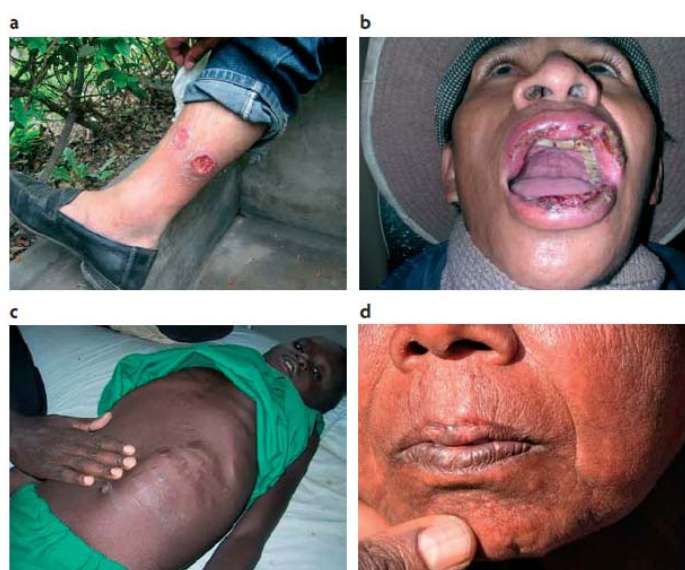


Figura 1. Formas clínicas das leishmanioses. a. Paciente do Peru com leishmaniose cutânea. b. Paciente da Bolívia com leishmaniose muco-cutânea localizada. c. Paciente da Uganda com leishmaniose visceral. d. Paciente da Índia com leishmaniose muco-cutânea difusa (modificada de CHAPPUIS et al., 2007).

As leishmanioses são endêmicas em 22 países no Novo Mundo (Américas) e em 66 no Velho Mundo (Europa, Ásia, África), sendo encontradas principalmente no sudeste da Ásia, na África Oriental e no Brasil (ASSCHE et al., 2011).

Caracterizadas pela diversidade e complexidade, as leishmanioses são causadas por mais de 21 espécies de *Leishmania* e transmitidas aos seres humanos por aproximadamente 30 diferentes espécies de flebotomíneos (CUNNINGHAM, 2002).

2.2 Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença sistêmica que pode ser fatal, caso não seja atendida e diagnosticada rapidamente, seguida de tratamento cuidadoso e criterioso. É causada por parasitas intracelulares obrigatórios pertencentes ao complexo *Leishmania donovani* - *L. donovani* no leste da África e no subcontinente indiano, *Leishmania infantum* na Europa e Norte de África, e *Leishmania chagasi* nas Américas (LUKES et al., 2007; MAURICIO et al., 2000). A LV pode ser transmitida por seringas compartilhadas entre usuários de drogas intravenosas, por transfusão de sangue e congenitamente de mãe para filho, mas estes modos de transmissão são mais raros do que a transmissão vetorial (WHO, 2010).

Os vetores pertencem à subfamília *Phlebotominae*, que se divide em dois gêneros principais: *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Na Europa, na Ásia e na África, os vetores das espécies causadoras da leishmaniose visceral são do gênero *Phlebotomus* (GREENE et al., 2006; LAINSON & SHAW, 1987). Nas Américas, os vetores são do gênero *Lutzomyia* (PEARSON & SOUSA, 1996).

No Brasil, duas espécies estão relacionadas com a transmissão da doença, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. A primeira é considerada a principal espécie transmissora da *Leishmania chagasi*, mas a *Lutzomyia cruzi* também foi incriminada como vetor em uma área específica do estado do Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2005).

A leishmaniose visceral é considerada uma zoonose, embora existam formas antroponóticas, em que os seres humanos são o único reservatório. Várias espécies de mamíferos, incluindo caninos (*Canis familiaris*), raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*), roedores e marsupiais (*Didelphis albiventris*) podem ser reservatórios e são responsáveis pela manutenção a longo prazo da *Leishmania* na natureza (ASHFORD, 1996; MAGILL, 2000). A maioria dos reservatórios é bem adaptada e desenvolve a forma assintomática ou apenas infecções leves que podem persistir por anos. Uma importante exceção é o cão, que pode desenvolver a doença sintomática, generalizada e fatal (DEDET & PRATLONG, 2009).

A LV é endêmica em 62 países, com um total de 200 milhões de pessoas em risco. Há uma estimativa de 500.000 novos casos de LV e mais de 50.000 mortes

pela doença a cada ano (DESJEUX, 2004), número de mortes que é superado entre as doenças parasitárias apenas pela malária (WHO, 2002).

A maioria (> 90%) dos casos ocorre em apenas seis países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil (Figura 2). Migração, falta de medidas de controle e co-infecção com HIV são os três principais fatores do aumento da incidência da LV no mundo (BOELAERT et al., 2000; DESJEUX, 2001).

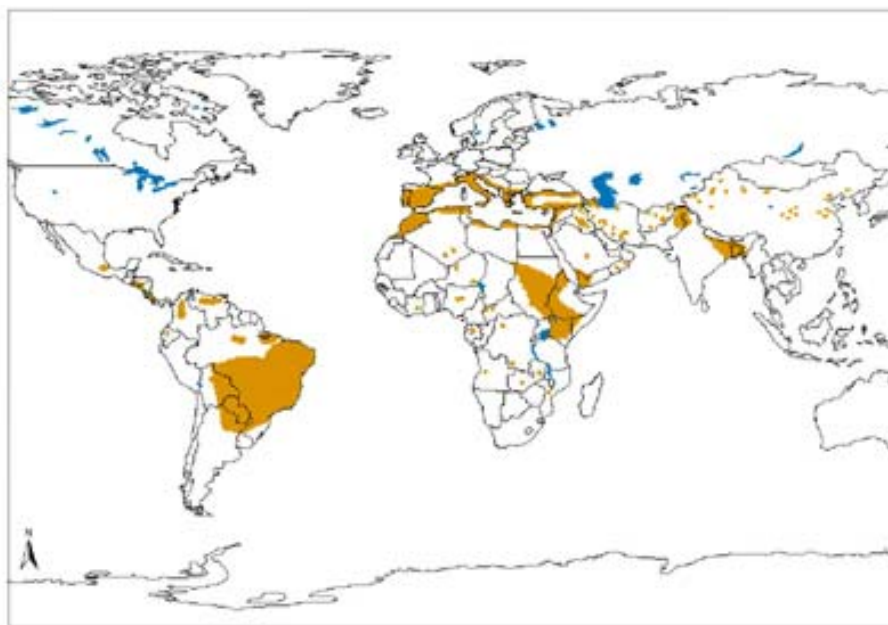


Figura 2. Distribuição geográfica da Leishmaniose visceral no Velho e Novo Mundo (WHO, 2010).

No Brasil, a doença está distribuída em 21 Unidades Federadas, atingindo as cinco regiões brasileiras (BRASIL, 2010). Primariamente, era uma doença de caráter rural. Entretanto, está se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte e se tornou um crescente problema de saúde pública no país, sendo uma endemia em franca expansão geográfica (BRASIL, 2005). Cidades das regiões Norte (a exemplo de Boa Vista e Santarém), Sudeste (entre elas Belo Horizonte e Montes Claros), Centro Oeste (citando-se Cuiabá e Campo Grande) e Nordeste (como Fortaleza, Terezina, Salvador, São Luís, Natal e Aracaju) têm sido foco da LV (GONTIJO & MELO, 2004; SINAN, 2011).

A razão da expansão da LV nos últimos anos é multifatorial, entre os quais se destacam o desmatamento desordenado, que culmina com a invasão do ambiente

peridomiciliar pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*; a presença de grande população do cão doméstico nas áreas endêmicas, susceptível à infecção pela *L. chagasi*, contribuindo para a manutenção do ciclo peridomiciliar; a migração de populações não imunizadas de outras regiões; o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e, finalmente, a difusão entre os profissionais médicos e paramédicos sobre a importância do diagnóstico da LV em indivíduos febris, principalmente crianças, procedentes de áreas endêmicas (LAINSON, 1988; LAINSON, 1989).

De 2000 a 2009 foram registrados 34.583 casos de LV no Brasil, com média anual de 3.458 casos confirmados. Nesse mesmo período, ocorreram 1.771 óbitos por LV, representados por uma letalidade de 5,1% (BRASIL, 2010).

Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos notificados de LV ocorreram na região Nordeste. Na medida em que a doença expandiu para outras regiões, essa situação vem se modificando e, recentemente, a região Nordeste representa 48% dos casos do país (BRASIL, 2010).

Em 2010, foram confirmados no Nordeste 1.662 casos de leishmaniose visceral. O Ceará lidera com 485 casos, seguido do Maranhão e da Bahia com cerca de 360. A Paraíba com 23 casos é o estado de menor incidência (SINAN, 2011).

Desde 1934, casos humanos de leishmaniose visceral (LV) vêm sendo registrados no Estado de Sergipe (CHAGAS, 1936). Em 2010, foram confirmados 75 casos, situando Sergipe em quinto lugar da região Nordeste, ficando atrás somente do Ceará, Maranhão, Bahia e Piauí (SINAN, 2011).

2.3 Ciclo Biológico

O ciclo da *Leishmania* envolve o hospedeiro vertebrado e o vetor flebotomíneo (Figura 3). Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do flebotomíneo torna-se infectada após ingerir as formas amastigotas presentes nos fluidos intersticiais, células da pele ou sangue do hospedeiro infectado. No intestino dos flebotomíneos, as amastigotas são liberadas e se transformam em promastigotas flageladas. Estas passam por um processo chamado de metaciclogênese, em que a forma procíclica não infectiva adquire capacidade de virulência e é transformada na forma infecciosa denominada metacíclica (DA SILVA & SACKS, 1987). As promastigotas metacíclicas migram para a faringe e cavidade bucal, onde se

acumulam até que o flebótomo faça um novo repasto sanguíneo (CUNNINGHAM, 2002).

As formas promastigotas infectantes da *Leishmania* são inoculadas abaixo da pele do hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo. Uma vez transmitidos, os parasitas são internalizados pelas células dendríticas e macrófagos na derme (ALEXANDER & RUSSEL, 1992; BRITTINGHAM et al., 1999).

Após a fagocitose, as formas promastigotas ficam dentro de fagossomos, os quais se fundem com lisossomos, formando o fagolisossomo. Durante este processo, as formas promastigotas rapidamente se transformam em amastigotas dentro de 12-24 horas (SINGH et al., 2006), as quais resistem ao ambiente ácido e à ação destruidora das enzimas lisossomais, se multiplicam por divisão binária, destroem a célula hospedeira e infectam outras células fagocíticas. As amastigotas se disseminam através dos sistemas linfático e vascular (CHAPPUIS et al., 2007).

Sendo assim, nos hospedeiros mamíferos, a *Leishmania* é obrigatoriamente um parasita intracelular e existe na forma amastigota no interior de células do sistema mononuclear-fagocitário, principalmente macrófagos.

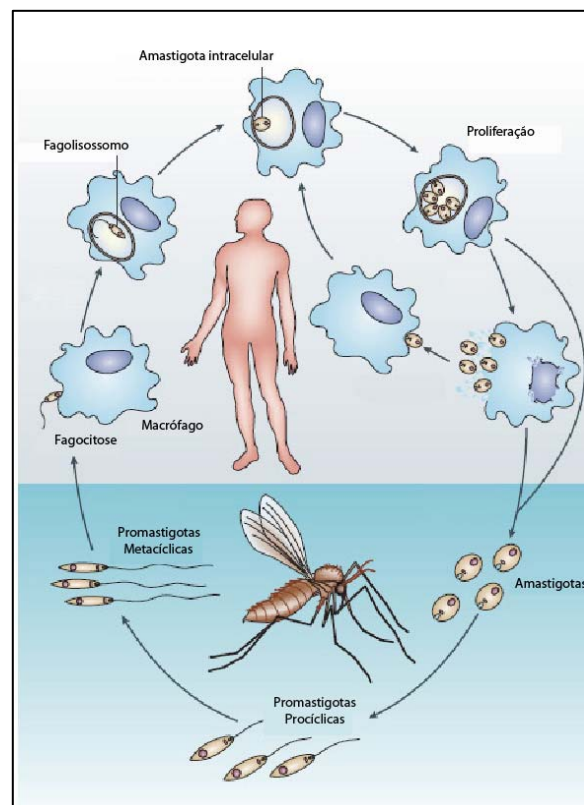


Figura 3. Ciclo biológico da *Leishmania donovani*. Modificado de CHAPPUIS et al., 2007.

2.4 A Doença no Homem

A leishmaniose visceral é uma doença com um amplo espectro de manifestações clínicas classificadas em três tipos: 1) forma assintomática, caracterizada por teste de Montenegro positivo contra antígenos de *Leishmania*, sem a presença de sinais e/ou sintomas; 2) forma oligossintomática, caracterizada por sorologia positiva e presença de sinais e/ou sintomas leves como febre, hepatomegalia leve e/ou esplenomegalia; 3) forma clássica ou sintomática, caracterizada por hepatoesplenomegalia, febre, pancitopenia, hipergamaglobulinemia e grave comprometimento da própria saúde (BADARÓ et al., 1986a).

O período de incubação varia de 10 dias até mais de um ano, e o início da doença é geralmente gradual. Os sintomas comuns são febre, mal-estar, calafrios, perda de peso, anorexia e desconforto no hipocôndrio esquerdo. Os sinais clínicos mais comuns são esplenomegalia, com ou sem hepatomegalia, palidez de mucosas. Linfadenopatia pode estar presente e ser a única manifestação clínica. Sinais de desnutrição (edema, alterações da pele e cabelo) podem se desenvolver com a progressão da doença (WHO, 2010).

Os fatores que normalmente predispõem à forma sintomática são o estresse, a má nutrição e a supressão da resposta imune, principalmente em co-infecções pelo HIV. A patogenia da LV é caracterizada pela internalização dos parasitas pelas células dendríticas e macrófagos na derme e sua transformação em amastigotas. Estas se multiplicam e sobrevivem em fagolisossomos através de uma interação entre o complexo parasita-hospedeiro (LODGE et al, 2006; RITTIG & BOGDAN, 2000). Os parasitas se disseminam através do sistema linfático e vascular, e infecta outros monócitos e macrófagos no sistema retículo-endotelial, resultando em infiltração na medula óssea, hepatoesplenomegalia e, por vezes, aumento dos gânglios linfáticos (linfadenopatia) (WHO, 2010).

No Brasil, a doença é mais frequente em menores de 10 anos (58%) e o sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (61%) (Brasil, 2010). A razão da maior suscetibilidade em crianças é explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular, agravado pela desnutrição, tão comum nas áreas endêmicas, além da maior exposição ao vetor no peridomicílio. Por outro lado, o envolvimento

do adulto tem repercussão significativa na epidemiologia da LV, uma vez que a infecção nem sempre condiz com a doença clínica e uma grande parte da população adulta possui a forma assintomática (BRASIL, 2010). No Brasil, a proporção de infecções assintomáticas e sintomáticas varia de 8:1 a 18:1 (BADARÓ et al., 1986a; EVANS et al, 1992).

A alta prevalência de infecções assintomáticas em áreas endêmicas, principalmente na população adulta, é justificada por uma imunidade ao parasita adquirida naturalmente. Os indivíduos assintomáticos apresentam anticorpos específicos e/ou resposta de células T aos antígenos de *Leishmania* como indicado pelos resultados positivos ao teste de Montenegro, cuja prevalência cresce com o aumento da idade (BADARÓ et al., 1986a; DESJEUX, 1992; KURTZHALS et al., 1992; SACKS et al, 1987; WHO, 2010).

2.5 Resposta Imunológica contra a *Leishmania*

O número de indivíduos assintomáticos é bem superior ao dos que apresentam a doença, indicando que a maioria das pessoas tem condições de destruir os parasitas e impedir a progressão da infecção. Em contraste, as deficiências imunológicas, sejam da imunidade inata (disfunções de células fagocíticas, células NK (Natural Killer) e deficiência do sistema Complemento) ou da imunidade adaptativa (deficiência da função de células T), estão fortemente associadas com aumento de susceptibilidade à Leishmaniose (JANEWAY, 2001).

2.5.1 Resposta Imune Adaptativa na Leishmaniose Visceral

A resposta imune mediada por células tem um papel importante no controle da infecção por *Leishmania* (BACELLAR & CARVALHO, 2005). Após a fagocitose, dentro dos macrófagos as leishmanias podem estimular tanto as células TCD4+ através da expressão de antígenos associados ao MHC classe II, como também células TCD8+ através da expressão de antígenos associados a moléculas do MHC classe I. Os Linfócitos T CD4+ podem ser subdivididos em pelo menos duas subpopulações: T “Helper” tipo 1 (Th1) e T “Helper” tipo 2 (Th2), definidas de acordo com perfis distintos de secreção de citocinas (Figura 4).

Linfócitos Th1 e Th2 se desenvolvem a partir de células precursoras virgens e vários fatores contribuem para esta diferenciação como, por exemplo, o tipo de célula apresentadora de antígeno, a natureza dos sinais coestimulatórios, via e dose de administração do antígeno e presença de citocinas (GUMY et al., 2004). IL-12, produzida por macrófagos e células dendríticas, é descrita como fator dominante na diferenciação de células Th1 a partir da célula virgem precursora T CD4+ (TRINCHIERI, 1995; DEL VECCHIO et al., 2007). Este comprometimento para Th1 é otimizado por IFN- γ , produzido também por células Natural Killer (NK), o qual aumenta a expressão de receptores para IL-12, além de inibir o desenvolvimento de células Th2 (O'GARRA, 1998; FOULDS et al., 2006). Por outro lado, a produção de IL-4 no início de uma resposta imune é descrita como fator indispensável para a polarização no sentido Th2 (SWAIN, 1993).

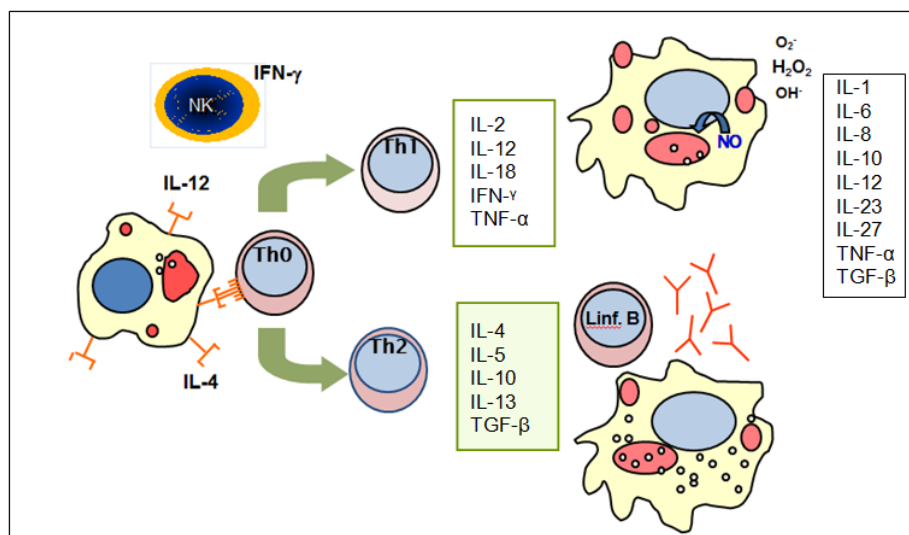


Figura 4. Mecanismo imunológico no curso da infecção por *Leishmania*.

As citocinas liberadas pelas células Th1 (IL-2, IL-12, IL-18, IFN- γ , TNF- α) favorecem o desenvolvimento de resposta imune celular e estão envolvidas principalmente na defesa contra patógenos intracelulares, através da ativação de macrófagos. Por outro lado, as citocinas liberadas pelas células Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TGF- β) favorecem o desenvolvimento da resposta imune humoral, ativam as defesas contra patógenos extracelulares (ABBAS et al., 1996; GUMY et al., 2004; MOSMANN et al., 1986).

INF- γ parece ser a citocina mais efetiva do hospedeiro no controle da infecção por *Leishmania* spp. Esta citocina, produzida por células Th1 e células NK, estimula a atividade microbicida de macrófagos com produção de óxido nítrico. Outras citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-6, IL-12 e IL-18 agem em sinergismo com o INF- γ , enquanto outras como IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TGF- β inibem a síntese de INF- γ (AWASTHI et al., 2004; BACELLAR & CARVALHO, 2005; BOGDAN et al., 2000).

Por outro lado, citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-12 podem ser tóxicas quando produzidas em quantidades elevadas. Entretanto, a IL-10 bloqueia a ativação de células Th1 e, conseqüentemente, previne a superprodução dessas citocinas, evitando dano tecidual (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998). Outras funções da IL-10 são inibir a síntese de citocinas/quimiocinas produzidas por macrófagos como IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-23, IL-27, TNF- α , TGF- β , G-CSF, GM-CSF, MIF; inibir a função de macrófagos e os eventos metabólicos associados com a sua ativação; inibir a expressão de moléculas co-estimulatórias e MHC classe II, dentre outras.

O papel da ativação de Th1 e Th2, determinando resistência ou suscetibilidade à leishmaniose foi avaliado a partir de modelos experimentais, utilizando-se camundongos suscetíveis BALB/c e camundongos resistentes C3H/HeN infectados com *L. (L.) major*. Os camundongos C3H/HeN desenvolveram uma resposta do tipo Th1, com produção de IL-2 e INF- γ , citocinas pró-inflamatórias, sendo capazes de controlar a multiplicação das leishmanias. Já os camundongos BALB/c desenvolveram uma resposta Th2 após a infecção com *L. (L.) major*, com alta produção das citocinas IL-4 e IL-10, desenvolvendo a doença grave e progressiva (HEINZEL et al., 1991). Foram observados em humanos com leishmaniose que não apresentam cura espontânea, níveis elevados de IL-4 e IL-10, citocinas relacionadas com a proliferação dos parasitas e a severidade da doença (KHARAZMI et al., 1999).

Em geral, a leishmaniose visceral distingue-se pela mistura de respostas Th1 e Th2, normalmente com um saldo positivo para a resposta Th2 (BACELLAR et al., 2000), ou seja, há um aumento da produção de múltiplas citocinas e quimiocinas, dentre elas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IP-10, MIG, IFN- γ e

fator de necrose tumoral (TNF- α). Entretanto, pacientes com a doença ativa têm níveis mais elevados de IL-10 no soro (GHALIB et al., 1993). Esses achados sugerem que a clínica desfavorável não está apenas relacionada com o domínio da resposta Th2 ou defeito na resposta Th1, mas que outros imunossupressores ou mecanismos imunes de evasão da *Leishmania* contribuem para a patogênese de LV.

2.5.2 Resposta Imune Inata na Leishmaniose Visceral

As células da resposta imune inata apresentam um papel importante não apenas nos mecanismos de destruição inicial do patógeno, mas também no direcionamento do tipo de resposta imune adaptativa gerada. Vários componentes da resposta imune inata participam do mecanismo de defesa contra as Leishmanias (ZAMBRANO-VILLA et al., 2002).

2.5.2.1 Sistema Complemento

Uma das tentativas para eliminar o parasita seria por meio da lise direta pelo sistema Complemento. Entretanto, as formas infectantes metacíclicas são resistentes à ação do Complemento, que, ao invés de promover a lise, opsonisa as leishmanias com moléculas C3b e C3bi, as quais favorecem a fagocitose, pois se ligam aos receptores de macrófagos CR1 e CR3, respectivamente (BOGDAN et al., 1996; BOGDAN & ROLLINGHOFF, 1998).

2.5.2.2 Neutrófilos

Segundo Van Zandbergen et al. (2007), a infecção de neutrófilos por *Leishmania major* segue o modelo “Cavalo de Tróia”, sendo um mecanismo para entrada “silenciosa” dos parasitas nos macrófagos.

Após a picada do flebotomíneo, sua saliva estimula um rápido influxo de neutrófilos no local da lesão e posterior fagocitose dos parasitas de *L. major* ali presentes (PETERS et al., 2008), evitando a morte dos parasitas no meio extracelular. Alternativamente, neutrófilos infectados podem liberar parasitas melhor adaptados à sobrevivência em macrófagos (KRYSKO et al., 2006; GREGORY & DEVITT, 2004). Sendo assim, os neutrófilos não estão necessariamente envolvidos

na destruição dos parasitas, podendo funcionar como reservatórios para liberação tardia da *Leishmania*.

Prates et al. (2011) descreveu que a saliva de *L. longipalpis* desencadeia a apoptose de neutrófilos. O efeito proapoptótico da saliva foi devido a ativação da caspase e expressão de FasL na superfície dos neutrófilos. Entretanto, Aga et al. (2002) demonstrou que a *Leishmania* inibe a ativação da caspase 3, enzima intimamente relacionada aos mecanismos apoptóticos. Com a chegada dos macrófagos ao foco inflamatório, ocorre interação destas células com os neutrófilos que tardiamente entram em apoptose.

2.5.2.3 Células “Natural Killer”

As células “Natural Killer” (NK) também participam da imunidade inata, porém ainda existem controvérsias quanto ao seu papel na infecção experimental por *Leishmania major*. Scharon-Kersten et al. (1995 e 1997) descreveram que as células NK são fundamentais no direcionamento da resposta Th1 na infecção por *L. major*, uma vez que esta população celular representa uma importante fonte de IFN- γ que pode otimizar a produção de IL-12 por células T ativadas (SCHARTON et al., 1993). Além disso, estas células exercem uma potente atividade citotóxica contra células infectadas (MULLER et al., 2001).

Entretanto, Nylen et al. (2003) demonstraram que após ativação antígeno-específica, células NK de indivíduos portadores de LV clássica não produzem IFN- γ , contribuindo para o desenvolvimento de uma resposta imune ineficaz e o favorecimento do crescimento do parasita.

2.5.2.4 Inflamassomas e Receptores Toll-like

Os inflamassomas são importantes reguladores da inflamação e são necessários para a ativação proteolítica da caspase-1. Vários estudos têm demonstrado que a caspase-1 em macrófagos murinos contribui efetivamente para a restrição da multiplicação de parasitas intracelulares, como a *Leishmania*, por mecanismos ainda não identificados (LAMKANFI et al., 2007; AMER et al., 2006). A caspase-1 por sua vez é necessária para o processamento proteolítico e secreção de citocinas pro-inflamatórias tais como IL-1 β e IL-18, como também para a indução

de um tipo de morte celular denominada piroptose (FINK & COOKSON, 2005; KUIDA et al., 1995). Entretanto, estudos indicam que a *Leishmania* pode inibir a ativação do inflamassoma, consequentemente os macrófagos não conseguem ser ativados.

Várias proteínas já foram descritas como iniciadoras da formação do complexo inflamassoma: NLRP1, NLRP3, NLRC4 e AIM-2. O NLRP3 inflamassoma, além de ser a via mais estudada, é a que chama mais atenção dos pesquisadores devido à sua capacidade de reconhecer vários estímulos de diferentes origens. Estudo realizado por Bauernfeind et al. (2011) indica que a inibição do ROS (espécies reativas do oxigênio) bloqueia a ativação do NLRP3 inflamassoma, pois a ativação da via do NLRP3 requer um estímulo inicial que induza à expressão desta molécula, que é produzida em baixos níveis nos macrófagos não estimulados.

Estudo realizado por Cortez et al. (2011) mostrou que *L. amazonensis* promove sua própria sobrevivência por meio da indução da expressão do ligante imunoregulatório CD200, que inibe a iNOS do hospedeiro, reduzindo a produção de óxido nítrico. CD200 é induzida por agonistas de inflamassomas NALP3 e limita a ativação da caspase-1 e secreção IL-1 β (MUKHOPADHYAY et al., 2010).

Por sua vez, a interação entre CD200-CD200R inibe a resposta inflamatória inata mediada por TLR-, NOD2-, e NALP3, tanto *in vivo* quanto *ex vivo*, e é essencial para proteger o hospedeiro de septicemias letais (MUKHOPADHYAY et al., 2010).

Receptores Toll-like (TLRs) estão presentes em células da resposta imune inclusive em macrófagos. O direcionamento da resposta Th1 e Th2 de linfócitos está envolvido com o que é produzido por células dendríticas após o reconhecimento de antígenos de patógenos por receptores Toll-like presentes nessas células. Eles são cruciais na regulação da resposta imune inata contra os patógenos, e 11 TLRs foram identificados em mamíferos. Segundo Borges et al. (2001), os TLRs reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e isso induz a produção de sinais responsáveis pela ativação de genes importantes para a defesa imune do hospedeiro, como maturação, fagocitose e atividade microbicida de fagócitos (AKIRA, 2003).

Dentre os TLRs, destacam-se o TLR4 e o TLR2. Este está associado à proteção do hospedeiro contra doenças infecciosas e parasitárias. Na leishmaniose,

a ativação do TLR2 é, em parte, responsável pela ativação de macrófagos com secreção de citocinas como IL-12 e TNF- α e aumento da produção de NO, inibindo a proliferação do parasita (SILVESTRE et al., 2009). No entanto, a infecção pela *Leishmania donovani* modula negativamente a via da MAPK P38 estimulada pelo TLR2, suprimindo a produção de IL-12, além disso, promove aumento da IL-10 via ERK1/2 (CHANDRA & NAIK, 2008).

Em experimentos com ratos, Kropf et al. (2004) observou o envolvimento do TLR4 no controle da infecção por *Leishmania major* através do aumento da expressão da iNOS. Além disso, Debus et al. (2003) e de Veer et al. (2003) demonstraram que o LPG não tem efeito sobre TLR4.

Estudos confirmam a importância de TLRs no início da patogênese da leishmaniose, levando à susceptibilidade ou à resistência, uma vez que foi evidenciado que os TLRs podem regular o equilíbrio Th1 / 2 (DE VEER et al., 2003; FLANDIN et al., 2006). Os efeitos terapêuticos da ativação dos TLRs estão associados com a expressão de níveis elevados de IFN- γ e a expressão precoce de IL-12. Entretanto, micro-organismos patogênicos podem também modular ou interferir no reconhecimento de padrões mediados pelos receptores toll-like (TLRs) e usar os TLRs como um mecanismo de escape do hospedeiro (NETEA et al., 2004).

2.5.2.5 Infecção de Macrófagos e Mecanismos Microbicidas

Outro fator importante na imunidade inata é a função dos macrófagos. No entanto, em infecções por *Leishmania*, as atividades microbicidas de macrófagos são severamente prejudicadas, levando à sobrevivência e proliferação dos parasitas dentro dos mesmos (OLIVIER et al., 2005).

Parasitas intracelulares muitas vezes manipulam as células hospedeiras para torná-las mais propícias para o estabelecimento da infecção e a sua propagação dentro delas (ANDERSON et al., 2005; DENKERS & BUTCHER, 2005; GREGORY & OLIVIER, 2005; HANDMAN & BULLEN, 2002; MÜLLER et al., 2003). Estudos recentes mostram que a *Leishmania* segue este paradigma, a fim de infectar macrófagos de mamíferos. Evidências sobre os mecanismos utilizados pela *Leishmania* para atingir o seu objetivo provêm principalmente de estudos que comparam macrófagos não infectados com macrófagos infectados por *Leishmania*

(BATES, 2006; CHANG et al., 1990; DENKERS & BUTCHER, 2005; GREGORY & OLIVIER, 2005; HANDMAN & BULLEN, 2002; MISRA et al., 2005; OLIVIER et al., 2005).

Espelhando-se na nomenclatura Th1/Th2, muitos se referem a macrófagos polarizados como células M1 e M2. Macrófagos do tipo M1 são induzidos por IFN- γ somente ou em conjunto com estímulos microbianos como o Lipopolissacarídeo (LPS), ou citocinas como TNF e GM-CSF. Células M1 possuem o fenótipo de produzirem concentrações elevadas de IL-12 e IL-23, e baixas concentrações de IL-10. São hábeis produtoras de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, além de citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF e IL-6). Contribuem como células indutoras e efetoras em respostas Th1, e são resistentes contra parasitas intracelulares (GORDON, 2003; MANTOVANI et al., 2005).

Em contraste, a forma alternativa M2 da ativação do macrófago é um nome genérico utilizado para várias formas de macrófagos ativados não-classicamente, resultantes da exposição celular às interleucinas IL-4 ou IL-13, imunocomplexos, IL-10 (GORDON, 2003; MANTOVANI et al., 2005). A forma M2 possui o fenótipo de baixa produção de IL-12 e IL-23, e alta produção de IL-10 (MANTOVANI et al., 2005). Estudo realizado por Farrow et al. (2011) sugere que as *Leishmanias* se propagam preferencialmente dentro de macrófagos do tipo M2 por serem mais propensos à infecção.

Quando ativados, os macrófagos desempenham um papel fundamental no processo inflamatório em diferentes tecidos. Eles são capazes de secretar citocinas pró-inflamatórias (tais como IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1), radicais livres do oxigênio, proteases e outras enzimas (LEE et al., 1985).

Todas as espécies de *Leishmania* parasitam células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro. Embora o parasitismo de promastigotas de *Leishmania* possa ser verificado em todos os fagócitos, elas sobrevivem apenas em macrófagos e monócitos imaturos (ALEXANDER & RUSSEL, 1992).

Após o reconhecimento da *Leishmania*, macrófagos são ativados e se tornam as chamadas "células efetoras", que podem fagocitar e destruir o hóspede indesejado. Vários processos celulares começam após a ativação dos macrófagos, incluindo a produção de enzimas de degradação fagolisossomais (ex: proteases,

nucleases, fosfatases, lipases e esterases), a geração do estresse oxidativo com produção de superóxido (O_2^-) e a produção de óxido nítrico (NO) (ASSCHE et al., 2011).

As enzimas lisossomais induzem um efeito tóxico direto e acidificação do meio ambiente. A explosão oxidativa provocada pela enzima NADPH oxidase é o resultado do aumento dramático no consumo de oxigênio que é típico do processo de fagocitose. Depois da ativação de macrófagos, o aumento da concentração de várias citocinas tais como IFN- γ e TNF- α melhora a atividade da NADPH oxidase e, posteriormente, a produção de espécies reativas do oxigênio, como radical superóxido (O_2^-). A produção de O_2^- leva à formação espontânea ou enzimática de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^\bullet$), hipoclorito (ClO^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (BABIOR et al., 1973; BABIOR, 2000). Produtos microbianos como lipopolissacarídeo (LPS) também favorecem a ativação da NADPH oxidase (MAUEL & RANSIJN, 1997).

Os fagócitos também sintetizam óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina pela ação da enzima NO-sintetase induzida (iNOS), que é ativada por citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e em resposta ao estímulo de LPS (BOGDAN et al., 2000; LIEW et al., 1990). O NO é um importante radical livre microbicida que reage com o superóxido (O_2^-) gerando peroxinitrito ($ONOO^-$), potente oxidante de proteínas, lipídeos de membrana e DNA (WEINBERG et al., 1995).

Segundo Santos et al. (2012), alguns isolados de *L. chagasi* apresentam resistência natural ao óxido nítrico (NO). Sendo assim, a permanência de parasitas dentro de macrófagos é determinada pelo balanço entre a habilidade da resposta imune em ativar macrófagos infectados e a habilidade de os parasitas resistirem aos mecanismos citotóxicos de macrófagos ativados (MUKBEL et al., 2007).

É importante entender os fatores que predis põem alguns indivíduos a manifestar a doença ou o controle da infecção para o desenvolvimento de uma imunoterapia e/ou imunoprofilaxia.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a atividade leishmanicida de macrófagos infectados por *Leishmania chagasi* isolados de indivíduos tratados e assintomáticos para Leishmaniose visceral

3.2 Específicos

3.2.1 Avaliar a infecção em macrófagos isolados de indivíduos tratados e assintomáticos para Leishmaniose visceral quando infectados com o isolado de *L. chagasi* (LVHSE-07).

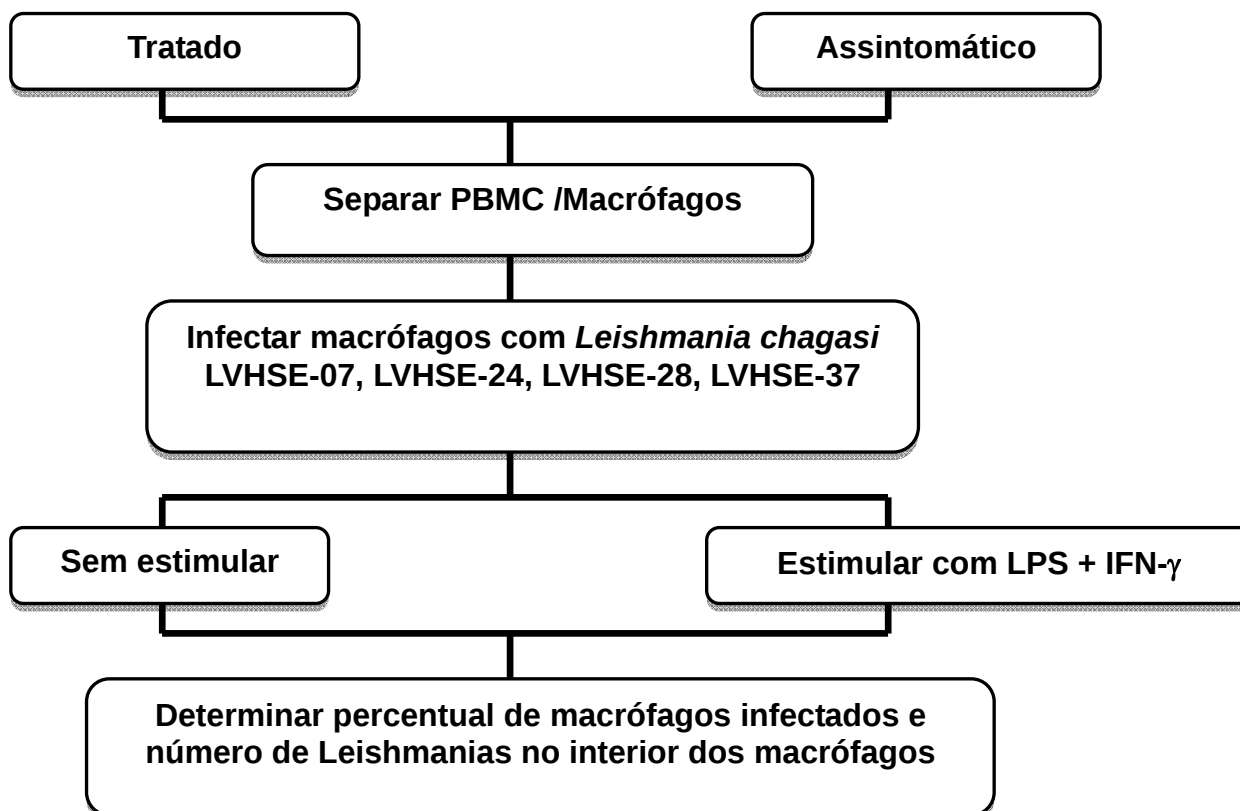
3.2.2 Avaliar a infecção em macrófagos isolados de indivíduos tratados para Leishmaniose visceral quando infectados com os seus próprios isolados de *L. chagasi* (LVHSE-24, LVHSE-28, LVHSE-37).

3.2.3 Avaliar a infecção em macrófagos isolados de pacientes assintomáticos para Leishmaniose visceral quando infectados com os isolados de *L. chagasi* dos indivíduos tratados (LVHSE-28, LVHSE-37).

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente estudo transversal foi realizado no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

4.1 Esquema do Estudo



4.2 Seleção de Pacientes

Foram selecionados sete pacientes e distribuídos em dois grupos. Os que foram diagnosticados com leishmaniose visceral (LV) e que após seis meses de tratamento apresentaram cura clínica foram enquadrados no grupo de indivíduos tratados, composto por cinco pacientes. Os que não apresentaram sinais nem sintomas para LV, mas que foram positivos para o Teste de Montenegro contra o antígeno de *Leishmania*, foram enquadrados no grupo de pacientes assintomáticos, composto por dois pacientes.

Foram adotados os seguintes critérios de seleção: tratados - indivíduos após 180 dias de tratamento para Leishmaniose visceral e curados, idade entre 18 e 60 anos, que não possuíam outras patologias associadas (Diabetes Mellitus, Hepatites virais, portadores do vírus HIV, entre outras); assintomáticos - familiares de indivíduos tratados com reação de Montenegro positiva, idade entre 18 e 60 anos, sem evidências de Leishmaniose visceral e que não possuíam outras patologias associadas (Diabetes Mellitus, Hepatites virais, portadores do vírus HIV, entre outras).

4.3 Cultura de *L. chagasi*

Promastigotas de *L. chagasi* foram descongeladas e cultivadas em meio bifásico com ágar sangue Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) e Schneider suplementado com soro bovino fetal e penicilina. As culturas foram mantidas em estufa de $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e examinadas diariamente em microscopia para avaliação da curva de crescimento.

Atualmente existem 75 isolados de *L. chagasi* congelados no freezer a -70°C do Laboratório de Biologia Molecular. Foram utilizados nesta pesquisa, os isolados LVHSE-07, LVHSE-24, LVHSE-28 e LVHSE-37, sendo que a *Leishmania chagasi* LVHSE-07 foi utilizada como controle.

4.4 Isolamento de Monócitos do Sangue Periférico

Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas do sangue venoso (40ml) heparinizado de 7 indivíduos (05 tratados e 02 assintomáticos) como descrito anteriormente por Souza et al. (2010). Brevemente, o sangue heparinizado foi diluído 1:2 com 0.9% de Cloreto de sódio (NaCl) e, por meio do gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (LSM; Organon Teknika corporation, Durham, NC, USA), as CMSP foram isoladas após centrifugação e coletadas da interface entre o plasma e o Ficoll. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com 0.9% NaCl e suspendidas em 3 ml do meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativo (SBF) (Sigma) e antibiótico (100 IU/mL penicilina) (Sigma). Foram ajustados 3×10^5 CMSP em 200 μl do meio de cultura para aderir em cada poço das placas de 8 poços LabTek® (Nalge Nunc International, Naperville, IL). Estas foram incubadas por 2 horas a 37°C com 5% de CO_2 , em seguida lavadas 2 vezes com 0.9% NaCl

para retirar as células que não aderiram. Os monócitos aderidos se diferenciaram em macrófagos após 5-7 dias a 37°C e 5% de CO₂.

4.5 Infecção de Macrófagos

Os macrófagos foram infectados com promastigotas de *Leishmania chagasi*. Para a infecção, promastigotas na fase estacionária foram lavadas por meio de centrifugação, suspendidas em RPMI 1640 e utilizadas para infectar macrófagos de pacientes sintomáticos e assintomáticos. As infecções foram realizadas em triplicata com uma proporção de parasita/macrófago de 5:1 por 2 horas a 37°C em 5% de CO₂. Foram removidos parasitas extracelulares por meio de lavagem cuidadosa, e os macrófagos infectados foram mantidos por 2, 72 e 96 horas. Cada placa LabTek possuía condições contendo ou não LPS (100 ng/mL) mais IFN- γ (10 ng/mL), adicionados 30 minutos antes da infecção. As células foram coradas com Panótico Rápido (LB-Laborclin Ltda) e o nível de infecção foi enumerado microscopicamente. Cada experimento foi realizado em triplicata. A proporção de células infectadas e o número de parasitas/100 macrófagos foram enumerados por três diferentes observadores, em condições experimentais cegas.

4.6 Considerações Éticas

Para a realização desta pesquisa todos os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), confirmando suas participações. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFS (CAAE-0162.0.107.000-09).

4.7 Análise Estatística

Para comparação entre grupos independentes e não paramétricos foi utilizado o teste de Mann-Whitney com intervalo de confiança de 95% (IC95%).

Os dados foram gerenciados no *software* EXCEL e analisados no GRAPHPAD PRISMA.

5 RESULTADOS

5.1 Seleção dos pacientes

O grupo dos tratados foi composto por 05 indivíduos, dentre eles 04 do sexo masculino e 01 do sexo feminino com idade média de 25,8 anos, enquanto que o grupo dos assintomáticos foi composto por 02 pacientes, sendo 01 do sexo masculino e 01 do sexo feminino com idade média de 36,5 anos (Tabela 01).

Tabela 01: Caracterização dos pacientes sintomáticos e assintomáticos segundo dados clínicos.

Variável	Grupo	Grupo	
	Tratado (n=5)	Assintomático (n=2)	
Média de Idade (anos)	25,8	36,5	
Gênero			
M (%)	4 (80)	1 (50)	
F (%)	1 (20)	1 (50)	

5.2 Macrófagos de indivíduos tratados foram mais infectados pelo isolado de *Leishmania chagasi* (LVHSE-07) do que os macrófagos de pacientes assintomáticos, e não controlaram a infecção

Para avaliar a capacidade em controlar a infecção por *L. chagasi*, macrófagos provenientes de indivíduos tratados e assintomáticos foram infectados com um isolado de *Leishmania chagasi* sensível ao NO (LVHSE-07) durante 2, 72 e 96 horas. No tempo de 2 horas, os macrófagos dos indivíduos tratados foram mais infectados ($30,63 \pm 13,11$) do que os dos assintomáticos ($19,37 \pm 9,74$) e, após 72 horas, o nível da infecção aumentou nos macrófagos dos tratados ($34,33 \pm 19,63$), enquanto reduziu nos macrófagos dos assintomáticos ($15,75 \pm 5,69$). Ao atingir 96 horas, os macrófagos dos tratados não controlaram a infecção ($28,31 \pm 17,82$), ao contrário dos macrófagos dos pacientes assintomáticos ($12,5 \pm 3,62$) ($p=0,014$) (Figura 5A).

Os macrófagos dos indivíduos tratados, após estímulo com LPS e IFN- γ , no tempo de 2 horas, foram duas vezes mais infectados ($40,78 \pm 21,36$) do que os dos assintomáticos ($21,75 \pm 13,81$). No tempo de 72 horas, observou-se que a infecção nos macrófagos dos tratados reduziu ($27,48 \pm 21,61$), todavia a redução foi maior, em aproximadamente 2,5 vezes, nos macrófagos dos assintomáticos ($8,75 \pm 3,5$). No tempo de 96 horas, os macrófagos dos tratados não controlaram a infecção ($25,71 \pm 22,46$), mesmo na presença do estímulo, ao contrário dos assintomáticos, que controlaram a infecção ($6,87 \pm 3,96$) ($p=0,008$) (Figura 5B). O controle da infecção pelos macrófagos dos assintomáticos foi maior na presença de LPS e IFN- γ ($6,87 \pm 3,96$) do que na ausência de estímulo ($12,5 \pm 3,62$).

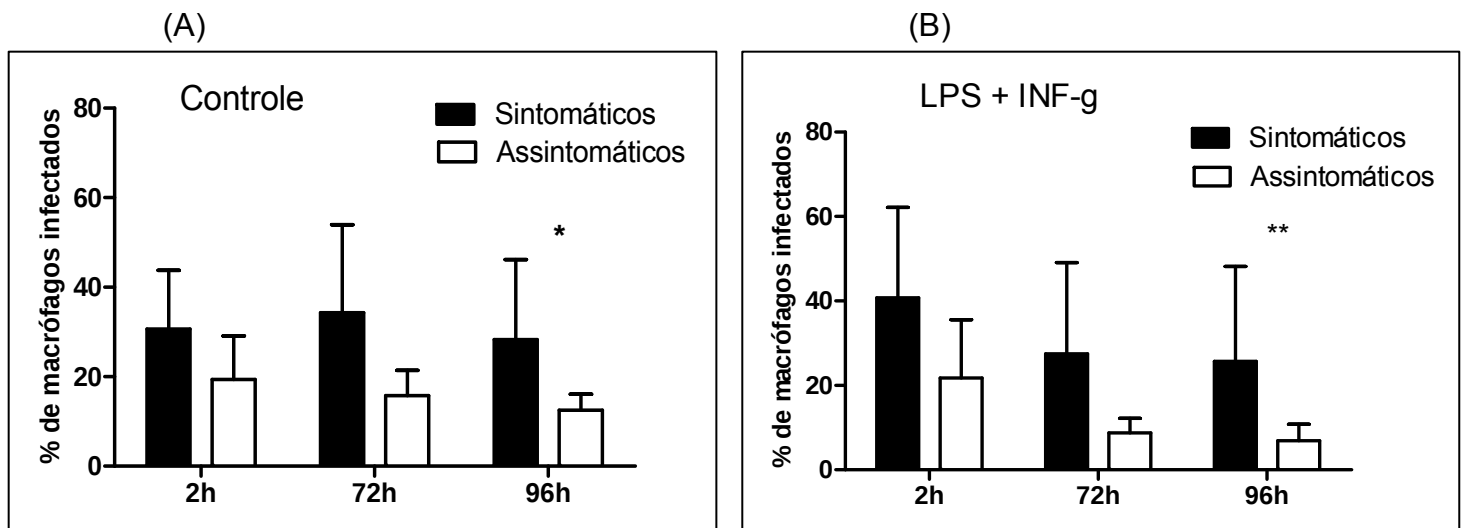


Figura 5. Infecção de macrófagos de indivíduos tratados e assintomáticos com o isolado LVHSE-07. Macrófagos foram infectados sem e com adição de estímulo LPS e IFN- γ durante 2, 72 e 96 horas. Em seguida, as lâminas foram fixadas e coradas para avaliar (A) a porcentagem de macrófagos infectados na ausência de estímulo e (B) porcentagem de macrófagos infectados na presença de estímulo. * $p=0,014$, ** $p=0,008$ (teste Mann-Whitney).

Para verificar a intensidade da infecção, foi contado o número de parasitas no interior dos macrófagos. No tempo de 2 horas, a carga parasitária nos macrófagos dos tratados foi 2 vezes maior ($89,34 \pm 66,31$) do que nos dos assintomáticos ($44,75 \pm 14,97$) e, após 72 horas, observou-se que o número de amastigotas no interior dos macrófagos dos sintomáticos aumentou ($123,74 \pm 113,50$), enquanto que se manteve controlado no grupo dos assintomáticos ($34,12 \pm 20,17$). No tempo de 96 horas, o número de amastigotas permaneceu elevado nos

macrófagos dos tratados ($116,29 \pm 123,22$), ao contrário dos assintomáticos, que conservaram a carga parasitária controlada ($30,5 \pm 13,77$) (Figura 6A).

Na presença do estímulo com LPS e IFN- γ , verificou-se que, no tempo de 2 horas, o número de parasitas no interior dos macrófagos dos indivíduos tratados foi aproximadamente 3 vezes maior ($143,16 \pm 122,23$) em comparação com os assintomáticos ($48 \pm 34,01$). Após 72 horas, observou-se uma leve redução do número de amastigotas no interior dos macrófagos dos tratados ($103,59 \pm 104,14$), enquanto que nos macrófagos dos assintomáticos foi reduzido pela metade ($24,87 \pm 21$). No tempo de 96 horas, os macrófagos dos tratados não controlaram a infecção ($110,39 \pm 139,79$), mesmo na presença do estímulo, ao contrário dos assintomáticos, que os resultados sugerem um controle da infecção ($14,37 \pm 11,70$) ($p=0,014$) (Figura 6B). O controle da infecção pelos macrófagos dos assintomáticos foi maior na presença de LPS e IFN- γ ($14,37 \pm 11,70$) do que na ausência de estímulo ($30,5 \pm 13,77$).

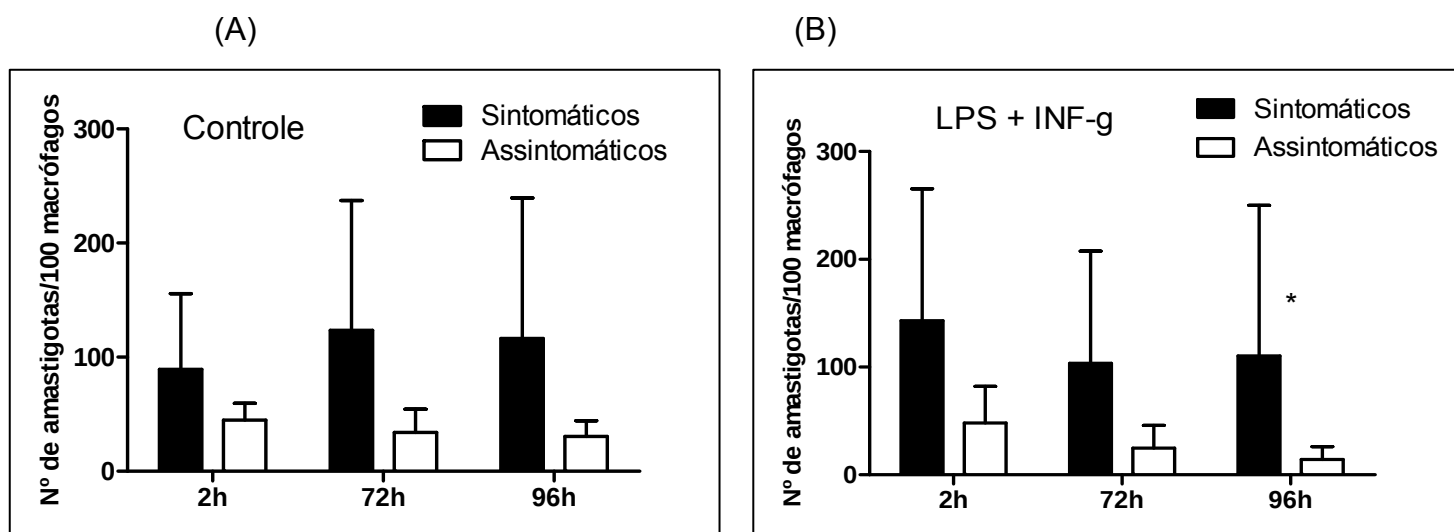


Figura 6. Infecção de macrófagos de indivíduos tratados e assintomáticos com o isolado LVHSE-07. Macrófagos foram infectados sem e com adição de estímulo LPS e IFN- γ durante 2, 72 e 96 horas. Em seguida, as lâminas foram fixadas e coradas para avaliar (A) o número de amastigotas em 100 macrófagos na ausência de estímulo e (B) o número de amastigotas em 100 macrófagos na presença de estímulo. * $p=0,014$ (teste Mann-Whitney).

5.3 Macrófagos de indivíduos tratados foram mais infectados com seus próprios isolados de *Leishmania chagasi* (LVHSE-24, LVHSE-28, LVHSE-37) do que com o isolado controle (LVHSE-07)

O desenvolvimento da LV está relacionado com a virulência do parasita e com a resposta imune do hospedeiro. Como os macrófagos dos indivíduos tratados foram mais infectados e não controlaram a infecção com o isolado LVHSE-07, reconvocamos três indivíduos tratados e infectamos seus macrófagos *in vitro* com seus próprios isolados de *Leishmania chagasi* (LVHSE-24, LVHSE-28, LVHSE-37) e com o isolado controle (LVHSE-07) para verificar se respondem de maneira diferenciada na presença do seu parasita.

No tempo de 2 horas, observou-se que a infecção foi semelhante tanto com os seus próprios isolados ($16,22 \pm 10,94$) quanto com o isolado controle ($19,83 \pm 5,81$). Entretanto, após 72 horas, os macrófagos apresentaram um perfil de infecção mais acentuado quando infectados com sua própria *Leishmania* ($26,77 \pm 6,9$) do que com a *Leishmania* controle ($23,5 \pm 7,31$). No tempo de 96 horas, os macrófagos mantiveram o mesmo nível de infecção quando infectados com a *Leishmania* controle ($17,16 \pm 5,23$), enquanto que com a sua própria *Leishmania* a infecção continuou aumentando ($30,33 \pm 10,58$) ($p=0,011$) (Figura 7A).

Na presença do estímulo com LPS e IFN- γ , observou-se que, no tempo de 2 horas, os macrófagos foram mais infectados com a *Leishmania* controle ($22,83 \pm 12,04$) do que com as *Leishmanias* dos próprios indivíduos tratados ($15,87 \pm 14,24$). Entretanto, no tempo de 72 horas, a infecção com a *Leishmania* controle foi reduzida ($13,5 \pm 5,24$), enquanto que aumentou com a *Leishmania* do próprio indivíduo tratado ($17 \pm 12,09$). Após 96 horas, apesar de ainda permanecerem infectados, os macrófagos reduziram em 50% a infecção quando com o isolado LVHSE-07 ($9,5 \pm 4,23$), ao contrário de quando infectados com seu próprio isolado, que continuou aumentando ($19,22 \pm 9,45$) ($p=0,033$) (Figura 7B).

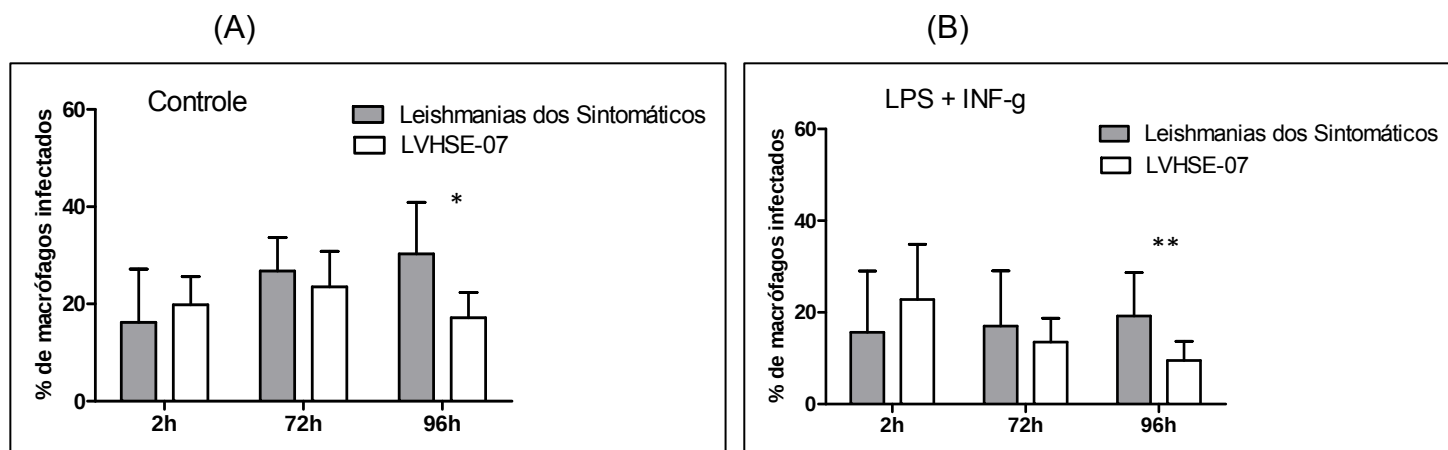


Figura 7. Infecção de macrófagos de indivíduos tratados com seus próprios isolados de *Leishmania chagasi* (LVHSE-24, LVHSE-28 ou LVHSE-37) e com a *Leishmania* LVHSE-07. Macrófagos foram infectados sem e com adição de estímulo LPS e INF- γ durante 2, 72 e 96 horas. Em seguida, as lâminas foram fixadas e coradas para avaliar (A) a porcentagem de macrófagos infectados na ausência de estímulo e (B) a porcentagem de macrófagos infectados na presença de estímulo. * $p=0,011$, ** $p=0,033$ (teste Mann-Whitney).

Para verificar a intensidade da infecção, foi contado o número de parasitas no interior dos macrófagos. No tempo de 2 horas, a carga parasitária foi maior com a *Leishmania* do próprio paciente ($60,88 \pm 48,31$) do que com a *Leishmania* controle ($40,66 \pm 10,53$). Após 72 horas, o número de amastigotas aumentou tanto com a *Leishmania* do próprio paciente ($72 \pm 28,91$) quanto com a *Leishmania* controle ($56,83 \pm 16,73$). Entretanto, no tempo de 96 horas, os macrófagos conseguiram manter a infecção com a *Leishmania* controle ($40,33 \pm 14,65$), enquanto que aumentou com a *Leishmania* do próprio paciente ($89,66 \pm 51,07$) ($p=0,011$) (Figura 8A).

Na presença do estímulo com LPS e IFN- γ , observou-se que, no tempo de 2 horas, o número de parasitas no interior dos macrófagos foi maior quando infectados com a *Leishmania* do próprio paciente ($44 \pm 40,82$) do que com a *Leishmania* controle ($39,5 \pm 23,77$). No tempo de 72 horas, a carga parasitária aumentou quando infectados com a *Leishmania* do próprio paciente ($52,11 \pm 41,17$), enquanto reduziu com a *Leishmania* LVHSE-07 ($25,33 \pm 10,53$). Após 96 horas, apesar de ainda haver infecção, a carga parasitária foi reduzida com o isolado LVHSE-07 ($20,16 \pm 11,65$), enquanto aumentou com o seu próprio isolado ($63,33 \pm 53,70$) (Figura 8B).

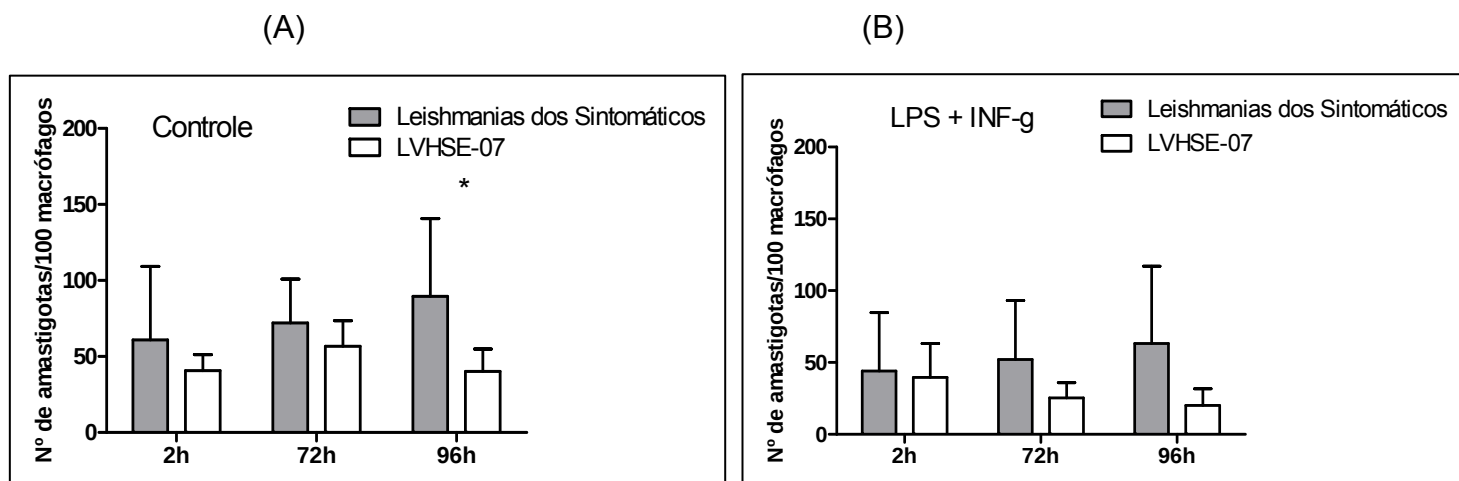


Figura 8. Infecção de macrófagos de indivíduos tratados com seus próprios isolados de *Leishmania chagasi* (LVHSE-24, LVHSE-28 ou LVHSE-37) e com a *Leishmania* LVHSE-07. Macrófagos foram infectados sem e com adição de estímulo LPS e INF- γ durante 2, 72 e 96 horas. Em seguida, as lâminas foram fixadas e coradas para avaliar (A) o número de amastigotas em 100 macrófagos na ausência de estímulo e (B) o número de amastigotas em 100 macrófagos na presença de estímulo. *p=0,011 (teste Mann-Whitney).

5.4 Macrófagos de pacientes assintomáticos controlaram a infecção com os isolados de *Leishmania chagasi* (LVHSE-28, LVHSE-37) dos indivíduos tratados

Para verificar se o isolado do indivíduo tratado também poderia interferir na resposta dos macrófagos dos pacientes assintomáticos, dois pacientes assintomáticos (assintomáticos 01 e 02) foram reconvocados e seus macrófagos infectados com a *Leishmania chagasi* dos indivíduos tratados (LVHSE-28 e LVHSE-37).

No tempo de 2 horas, os macrófagos dos assintomáticos foram mais infectados ($35 \pm 8,37$) do que os dos indivíduos tratados ($14,6 \pm 14,35$). Entretanto, a infecção nos macrófagos dos assintomáticos reduziu em 2,4 vezes no tempo de 72 horas ($14,5 \pm 4,04$), enquanto aumentou quase 2 vezes nos macrófagos dos tratados ($25,2 \pm 6,30$). Após 96 horas, os macrófagos dos assintomáticos apresentaram um perfil de controle da infecção ($9,25 \pm 4,79$). Ao contrário dos macrófagos dos tratados que mantiveram a infecção ($24,8 \pm 5,85$) (p=0,015) (Figura 9A).

Na presença do estímulo com LPS e IFN- γ , no tempo de 2 horas, os macrófagos dos assintomáticos foram mais infectados ($27,75 \pm 11,59$) do que os dos indivíduos tratados ($11,4 \pm 15,44$). Entretanto, a infecção nos macrófagos dos assintomáticos reduziu em quase 5 vezes no tempo de 72 horas ($6,5 \pm 2,65$), enquanto que a redução foi menor nos macrófagos dos tratados ($9 \pm 7,42$). Após 96 horas, os macrófagos dos assintomáticos apresentaram um perfil de controle da infecção ($6,5 \pm 4,12$) ao contrário dos macrófagos dos tratados que não controlaram a infecção ($13,8 \pm 6,91$) (Figura 9B).

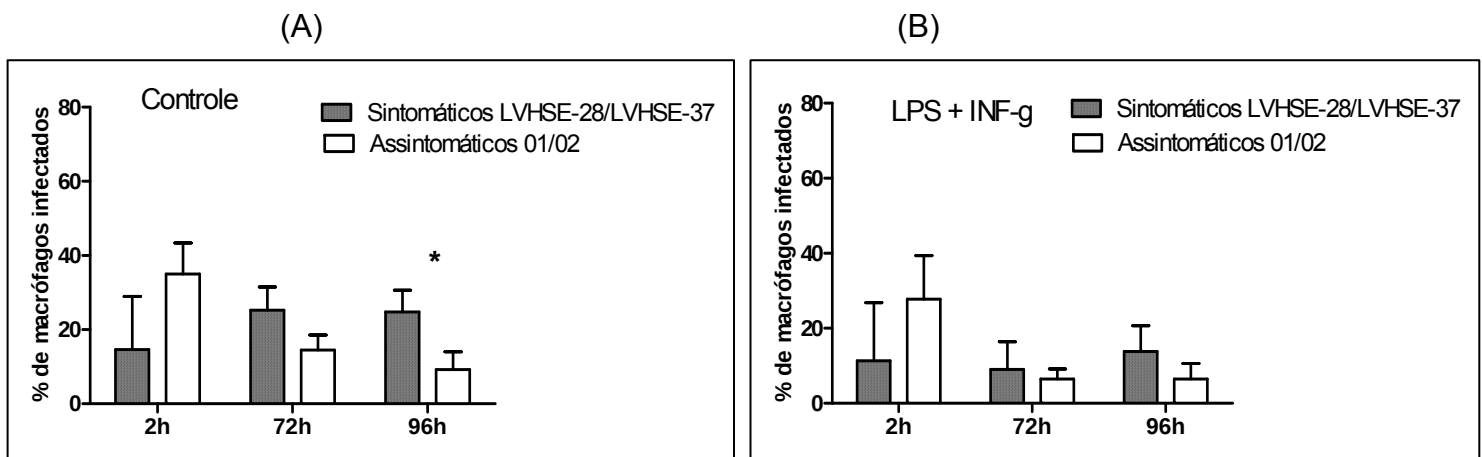


Figura 9. Infecção de macrófagos de indivíduos tratados e assintomáticos com o isolado de *Leishmania chagasi* do indivíduo tratado (LVHSE-28, LVHSE-37). Macrófagos foram infectados sem e com adição de estímulo LPS e INF- γ durante 2, 72 e 96 horas. Em seguida, as lâminas foram fixadas e coradas para avaliar (A) a porcentagem de macrófagos infectados na ausência de estímulo e (B) a porcentagem de macrófagos infectados na presença de estímulo. *p=0,015 (teste Mann-Whitney).

Para verificar a intensidade da infecção, foi contado o número de parasitas no interior dos macrófagos. No tempo de 2 horas, a fagocitose nos macrófagos dos assintomáticos foi maior ($79,25 \pm 14,86$) do que nos dos indivíduos tratados ($27 \pm 30,53$). Entretanto, no tempo de 72 horas, a carga parasitária reduziu nos macrófagos dos assintomáticos ($52,5 \pm 23,67$), enquanto duplicou nos macrófagos dos tratados ($56,2 \pm 14,81$). Após 96 horas, os macrófagos dos assintomáticos apresentaram um perfil de controle da infecção ($28,75 \pm 10,90$). Ao contrário dos macrófagos dos tratados que permaneceram com a carga parasitária ($55,8 \pm 10,47$) (p=0,015) (Figura 10A).

Na presença do estímulo com LPS e $\text{IFN-}\gamma$, no tempo de 2 horas, o número de parasitas nos macrófagos dos assintomáticos foi maior ($83,75 \pm 43,33$) do que nos dos indivíduos tratados ($27 \pm 35,42$). Entretanto, a carga parasitária nos macrófagos dos assintomáticos reduziu em 5,4 vezes no tempo de 72 horas ($15,5 \pm 8,43$), enquanto que a redução foi menor nos macrófagos dos tratados ($22 \pm 19,87$). Após 96 horas, os macrófagos dos assintomáticos apresentaram carga parasitária menor ($18,75 \pm 8,81$) do que os dos tratados ($25,4 \pm 14,21$) (Figura 10B).

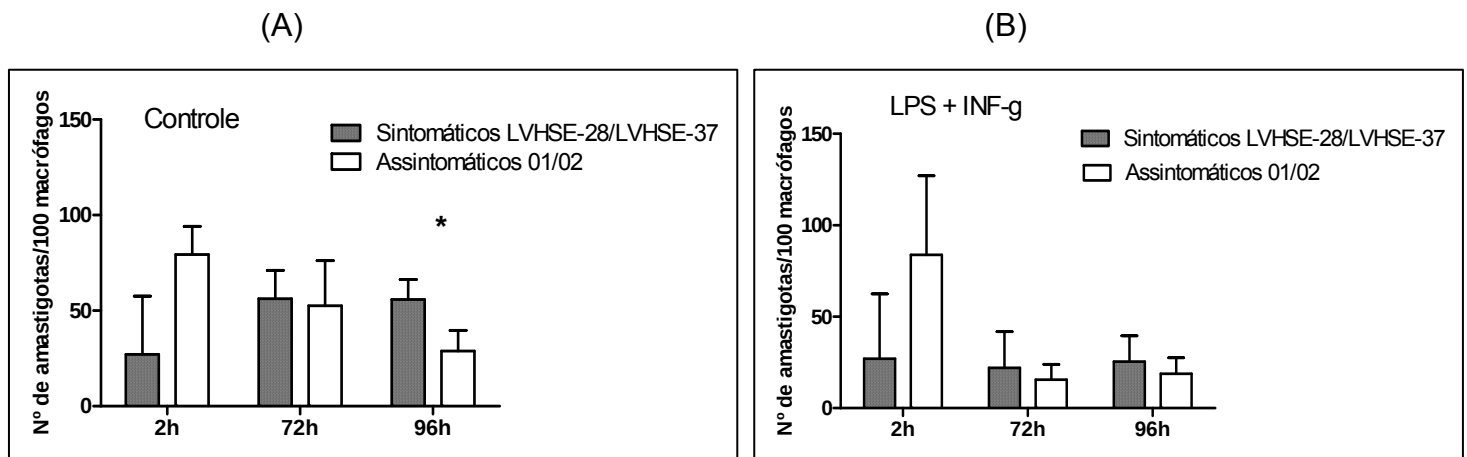


Figura 10. Infecção de macrófagos de indivíduos tratados e assintomáticos com o isolado de *Leishmania chagasi* do próprio indivíduo tratado (LVHSE-28, LVHSE-37). Macrófagos foram infectados sem e com adição de estímulo LPS e $\text{INF-}\gamma$ durante 2, 72 e 96 horas. Em seguida, as lâminas foram fixadas e coradas para avaliar (A) o número de amastigotas em 100 macrófagos na ausência de estímulo e (B) o número de amastigotas em 100 macrófagos na presença de estímulo. * $p=0,015$ (teste Mann-Whitney).

6 DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral é uma doença com um amplo espectro de manifestações clínicas classificadas em três tipos: forma assintomática, oligossintomática e sintomática (BADARÓ et al., 1986a).

As diferentes formas clínicas da doença estão associadas com a resposta imune contra a *Leishmania* que é modulada por vários fatores do hospedeiro como estado nutricional, idade e herança genética, assim como fatores intrínsecos do parasita, como espécie e cepa (ETTINGER et al., 2009; JERÔNIMO et al., 2007; KARPLUS et al., 2002).

A manifestação da doença sintomática requer mecanismos que permitam a replicação do parasita no hospedeiro e a sua resistência. Normalmente, as infecções sintomáticas ocorrem quando o ciclo regulatório do sistema imune falha devido à má nutrição, estresse, susceptibilidade genética ou supressão da resposta imune, principalmente em coinfeções pelo HIV (HOLADAY, 1999).

Entretanto, o número de indivíduos assintomáticos é superior ao dos que apresentam a doença, indicando que a maioria das pessoas tem condições de destruir os parasitas e impedir a progressão da infecção. Sendo assim, neste trabalho foi avaliada a atividade leishmanicida de macrófagos de indivíduos tratados e assintomáticos para Leishmaniose visceral para verificar se os macrófagos estão envolvidos com a susceptibilidade ou resistência à infecção.

Segundo Price et al. (1990) e Barthel et al. (2001), a característica de susceptibilidade ou resistência à infecção pode ser determinada por meio de análises *in vitro*, nas quais se observam variações nas taxas de infecção e de sobrevivência intracelulares dos patógenos nos macrófagos.

Foi escolhido inicialmente um isolado (LVHSE-07) de *Leishmania chagasi* sensível ao óxido nítrico para não haver interferências de mecanismos de resistência do parasita, pois alguns trabalhos científicos apontam que isolados resistentes inibem tanto a produção de óxido nítrico pelos macrófagos (ADHUNA et al., 2000; BALESTIERI et al., 2002) quanto acionam mecanismos enzimáticos que promovem sua proteção contra os intermediários reativos do oxigênio e do óxido nítrico (DOLAI et al., 2009; GHOSHAL et al., 2010; PLEWES et al., 2003).

A infecção foi acompanhada durante 2, 72 e 96 horas. O tempo de 2 horas permitiu avaliar a fagocitose. Este processo é mediado por interações entre as moléculas presentes na membrana do protozoário com os receptores de membrana do fagócito (ALEXANDER & RUSSEL, 1992; BRITTINGHAM et al., 1999). Os receptores de superfície de macrófagos implicados no reconhecimento da *Leishmania* incluem CR1, CR3, MR, TLR 2, 4 e 9, o receptor de fibronectina e o receptor para glicoconjugados avançados (BLACKWELL et al., 1985; DA SILVA et al., 1989; MARTINEZ-SALAZAR et al., 2008; MOSSER & EDELSON, 1985; MOSSER et al., 1987; WILSON & PEARSON, 1986; WYLER et al., 1985). Nossos dados sugerem que macrófagos de indivíduos tratados são mais infectados no tempo de 2 horas em relação aos macrófagos dos assintomáticos, provavelmente devido a uma maior expressão de receptores que facilitam a entrada do parasita, geralmente de forma silenciosa, na célula hospedeira (NADERER & MCCONVILLE, 2008).

Após o processo de fagocitose, as formas promatigotas rapidamente se transformam em amastigotas dentro de 12-24 horas (SINGH et al., 2006). Com isso, nos tempos de 72 e 96 horas, foi permitido avaliar o percentual de infecção e controle da carga parasitária pelos macrófagos, verificando se são susceptíveis ou resistentes. Neste estudo, foi observado que os macrófagos dos indivíduos tratados não controlaram a infecção quando infectados com o isolado (LVHSE-07) de *Leishmania chagasi*, diferente dos assintomáticos que controlaram a carga parasitária, reduzindo a infecção. Segundo Olivier et al. (2005), pacientes com LV possuem atividade prejudicada de macrófagos, sendo mais susceptíveis à infecção.

Nos indivíduos que não têm a capacidade de produzir IFN- γ e ativar macrófagos, a *Leishmania* dissemina-se e causa a leishmaniose visceral. Nesses pacientes é fácil entender o desenvolvimento da doença, pela deficiência de IFN- γ e alta produção de IL-10 (RIBEIRO DE JESUS et al., 1998). Independente da capacidade de os pacientes produzirem IFN- γ , tanto os macrófagos dos pacientes sintomáticos como os dos assintomáticos foram pré-estimulados com LPS e IFN- γ antes e durante a infecção. Em situações normais, quando a atividade leishmanicida dos macrófagos não está prejudicada, IFN- γ e LPS induzem a síntese de NO pelos

macrófagos, contribuindo para a eliminação do parasita e controle da infecção (FERRIC, 1997; JORENS et al., 1995; RITTER et al., 2004).

Em nosso estudo foi observado que, no tempo de 2 horas, não houve redução do parasitismo quando comparado com a ausência de estímulo, uma vez que o NO é mais importante como um mecanismo de defesa do macrófago durante a fase amastigota intracelular. Além disso, a fagocitose dura 2 horas e a ativação da iNOS, enzima responsável pela produção de óxido nítrico, necessita de 4 a 6 horas (WANG et al., 2009). Os resultados do estímulo foram melhor observados nos tempos de 72 e 96 horas em que os macrófagos dos indivíduos tratados, mesmo na presença do estímulo, não controlaram a infecção ao contrário dos assintomáticos que possuíam atividade leishmanicida normal. Este dado sugere que macrófagos de indivíduos tratados não conseguem ser estimulados na presença de LPS e IFN- γ , consequentemente reduz a produção de espécies reativas do oxigênio que, segundo Bauernfeind et al. (2011), são necessárias para a ativação do NLRP3 inflamassoma, sendo assim, há uma redução da produção de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β e IL-18.

O mesmo experimento foi realizado utilizando-se as *Leishmanias* dos próprios indivíduos tratados (LVHSE-24, LVHSE-28, LVHSE-37) para infectar seus macrófagos com o objetivo de verificar se respondiam de maneira diferenciada.

Os dados sugerem que indivíduos tratados são mais infectados com seus próprios isolados de *L. chagasi* do que com a *Leishmania* controle. Estudos indicam que parasitas intracelulares, como as *Leishmanias*, muitas vezes manipulam as células hospedeiras para torná-las mais propícias para o estabelecimento da infecção e a sua propagação dentro delas (ANDERSON et al., 2005; DENKERS & BUTCHER, 2005; GREGORY & OLIVIER, 2005; HANDMAN & BULLEN, 2002; MÜLLER et al., 2003). Segundo Darwin (1859), qualquer ser, se variar, de qualquer maneira lucrativa para si, terá melhor chance de sobrevivência e será selecionado naturalmente. Como as *Leishmanias* isoladas dos próprios pacientes já estavam adaptadas às células hospedeiras, o meio foi propício para o estabelecimento da infecção.

Entretanto, quando utilizados os isolados (LVHSE-28 e LVHSE-37) para infectar os macrófagos dos pacientes assintomáticos, os dados sugerem que estes

pacientes possuem um perfil de controle da infecção independente da *Leishmania* utilizada.

Estudos indicam que os resultados desfavoráveis da infecção não estão relacionados com uma dominante resposta Th2 ou um defeito na resposta Th1, mas sim à concomitante produção de citocinas como IL-10. Além de suprimir a geração ou manutenção de uma resposta Th1, a IL-10 pode promover condições para sobrevivência e crescimento do parasita nos macrófagos (NYLÉN & SACKS, 2007).

Como a forma alternativa M2 da ativação do macrófago é resultante da exposição celular às interleucinas IL-4 ou IL-13, imunocomplexos, IL-10 (GORDON, 2003; MANTOVANI et al., 2005), os macrófagos de pacientes sintomáticos seriam mais polarizados para o tipo M2. Estudo realizado por Farrow et al. (2011) sugere que as *Leishmanias* se propagam preferencialmente dentro de macrófagos do tipo M2 por serem mais propensos à infecção.

Entretanto, os macrófagos dos assintomáticos apresentam um perfil de controle da infecção por possuírem maior resposta Th1 e, conseqüentemente, uma maior quantidade de macrófagos do tipo M1, que são induzidos por IFN- γ , citocinas como TNF e GM-CSF. Células M1 são hábeis produtoras de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, além de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF e IL-6). Contribuem como células indutoras e efetoras em respostas Th1, e são resistentes contra parasitas intracelulares (GORDON, 2003; MANTOVANI et al., 2005).

7 CONCLUSÕES

- Macrófagos de indivíduos tratados são mais infectados e não controlam a infecção por *Leishmania chagasi*, sendo mais susceptíveis em comparação com macrófagos de pacientes assintomáticos.
- Macrófagos de indivíduos tratados são mais infectados com suas próprias Leishmanias.
- Macrófagos de pacientes assintomáticos são menos infectados por *L. chagasi* e apresentam uma carga parasitária menor que os macrófagos de indivíduos tratados, independente do isolado de *Leishmania* utilizado na infecção.
- Macrófagos estão relacionados com a susceptibilidade ou resistência à infecção por *Leishmania chagasi*.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K., MURPHY, K.M., SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v. 383, p. 787-93, 1996.
- ADHUNA, A., SALTORA, P., BHATNAGAR, R. Nitric oxide induced expression of stress proteins in virulent and avirulent promastigotes of *Leishmania donovani*. **Immunol Lett.** v.71, p.171-6, 2000.
- AGA, E., KATSCHINSKI, D.M., ZANDBERGEN, G.V., LAUFS, H., HANSEN, B., MULLER, K., SOLBACH, W., LASKAY, T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **J Immunol**, v. 169, p. 898-905, 2002.
- AKIRA, S. Toll like receptor signalling. **J Biol Chem**, v. 278, p. 38105–38108, 2003.
- ALEXANDER, J. & RUSSEL, D.G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **J Adv Parasitol.** v.31, p.175-254, 1992.
- AMER, A., FRANCHI, L., KANNEGANTI, T.D., BODY-MALAPEL, M, OZOREN, N., BRADY, G. et al. Regulation of *Legionella* phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. **J Biol Chem**, v. 281, p. 35217-35223, 2006.
- ANDERSON, C.F., MENDEZ, S., SACKS, D.L. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. **J Immunol**, v. 174, p. 2934–2941, 2005.
- ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clin. Dermatol**, v. 14, p. 523–532, 1996.
- ASSCHE, T.V, DESCHACHT, M., DA LUZ, R.A.I., MAES, L., COS, P. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology & Medicine.** v. 51, p.337–351, 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.
- BABIOR, B.M., KIPNES, R.S., CURNUTTE, J.T. Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **J. Clin. Invest.** v. 52, p. 741–744, 1973.
- BACELLAR, O., CARVALHO, E.M. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. **Gazeta Médica da Bahia.** v.75, p.24-34. 2005.

- BACELLAR, O., D'OLIVEIRA, A. JR., JERONIMO, S., CARVALHO, E.M. IL- 10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 12, p. 1228–1231, 2000.
- BADARÓ, R., JONES, T.C., CARVALHO, E.M. et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J. Inf. Dis.**, v.154, p.1003-1011, 1986a.
- BADARÓ, R., JONES, T.C., LORENÇO, R. et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J. Inf. Dis.**, v.154, p.639-649, 1986b.
- BALESTIERI, F. M., QUEIROZ, A. R., SAVONE, C., COSTA, V. M., BARRAL-NETTO, M., ABRAHAMSOHN, A. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes Infect.** v.4, p.23-29, 2002.
- BARTHEL, R., FENG, J., PIEDRAHITA, J.A. et al. Stable transfection of the bovine NRAMP1 gene into murine RAW264.7 cells: effect on *Brucella abortus* survival. **Infect. Immun.**, v.69, n.5, p.3110-9, 2001.
- BATES, P.A. Housekeeping by *Leishmania*. **Trends Parasitol**, v. 22, p. 447–448, 2006.
- BAUERNFEIND F, BARTOK E, RIEGER A, FRANCHI L, NÚÑEZ G, HORNUNG V. Cutting Edge: Reactive Oxygen Species Inhibitors Block Priming, but Not Activation, of the NLRP3 Inflammasome. **The Journal of Immunology**, 2011.
- BLACKWELL, J.M., EZEKOWITZ, R.A., ROBERTS, M.B., CHANNON, J.Y., SIM, R.B., GORDON, S. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. **J Exp Med.**, v.162, p.324–331, 1985.
- BOCEDI, A., DAWOOD, K. F., FABRINI, R., FEDERICI, G., GRADONI, L., PEDERSEN, J. Z., et al. Trypanothione efficiently intercepts nitric oxide as a harmless iron complex in trypanosomatid parasites. **FASEB J.**, v. 24, p. 1035–1042, 2010.
- BOELAERT, M., CRIEL, B., LEEUWENBURG, J., DAMME VAN, W., LE RAY, D., et al. Visceral leishmaniasis control: A public health perspective. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 94, p. 465–471, 2000.
- BOGDAN, C., GESSNER, A., SOLBACH, W., ROLLINGHOFF, M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Curr Opin Immunol**, v. 8, p. 517-525, 1996.
- BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **Int J Parasitol**, v. 28, p. 121-134, 1998.
- BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M., DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunol Ver.** v.173, p.17-26, 2000.

BORGES, M.M., CAMPOS-NETO, A., SLEATH, P., GRABSTEIN, K.H., MORRISSEY, P.J., SKEIKY, A.W., REED, S.G. Potent stimulation of the innate immune system by a *Leishmania braziliensis* recombinant protein. **Infect Immun**, v. 69, p. 5270-5277, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6ª edição. Brasília / DF, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 8ª edição. Brasília / DF, 2010.

BRITTINGHAM, A., CHEN, G., MCGWIRE, B.S., CHAG K.P., MOSSER, D.M. Interaction of *Leishmania* gp63 with Cellular Receptors for Fibronectin. **Infect Immun**. v. 67, p. 4477-4484, 1999.

BRITTINGHAM, A., MORRISON, C.J., MCMASTER, W.R., MCGWIRE, B.S., CHANG, K.P., MOSSER, D.M. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **Immunology** 155, p. 3102–3111, 1995.

CALDAS, A., FAVALI, C., AQUINO, D., VINHAS, V., VAN WEYENBERGH, J., BRODSKY, C., COSTA, J., BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **BMC Infect Dis**, v. 5, p. 113, 2005.

CHAGAS, E. Primeira verificação em indivíduo vivo da leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil Médico**, Rio de Janeiro, v. 50, p. 221-222, 1936.

CHAN, J., FUJIWARA, T., BRENNAN, P., MCNEIL, M., TURCO, S. J., SIBILLE, J. C., et al. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. **Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.**, v. 86, p. 2453–2457, 1989.

CHANDRA, D., NAIK, S. *Leishmania donovani* infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. British Society for Immunology, **Clinical and Experimental Immunology**, v. 154, p. 224–234, 2008.

CHANG, K.P., CHAUDHURI, G., FONG, D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. **Annu Rev Microbiol**, v. 44, p. 499–529, 1990.

CHAPPUIS, F., SUNDAR, S., HAILU, A., GHALIB, H., RIJAL, S., PEELING, R.W., et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature reviews microbiology**. v.5, p.7-16. 2007.

COELHO-CASTELO, A.A.M., TROMBONE, A.P.F., ROCHA, C.D., LORENZI, J.C.C. Resposta imune a doenças Infecciosas. *Medicina (Ribeirão Preto)*; 42(2), p.127-42, 2009.

CORTEZ, M., HUYNH, C., FERNANDES, M.C., KENNEDY, K.A., ADEREM, A., ANDREWS, N.W. *Leishmania* Promotes Its Own Virulence by Inducing Expression of the Host Immune Inhibitory Ligand CD200. *Cell Host & Microbe*, v. 9, p. 463-471, 2011.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. **Exp Mol Pathol**, v.72, n.2, Apr, p.132-41, 2002.

DA SILVA, R., SACKS, D.L. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. **Infect. Immun**, v. 55, p. 2802–2806, 1987.

DA SILVA, R.P., HALL, B.F., JOINER, K.A., SACKS, D.L. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania* major metacyclic promastigotes to human macrophages. **J Immunol**. v, 143, p. 617–622, 1989.

DE LIMA, W.G. Leishmaniose visceral canina: estudo quantitativo e comparativo da expressão do receptor do complemento do tipo 3 (CR3 CD11b/CD18) com alguns aspectos histológicos e parasitológicos do baço, fígado e linfonodos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Tese de doutorado. UFMG. 2007.

DE VEER, M.J., CURTIS, J.M., BALDWIN, T.M., DI DONATO, J.A., SEXTON, A., MCCONVILLE, M.J., HANDMAN, E., SCHOFIELD, L. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania* major: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. **Eur J Immunol**, v. 33, p. 2822–2831, 2003.

DEBUS, A., GLASNER, J., ROLLINGHOFF, M., GESSNER, A. High levels of susceptibility and T helper 2 response in MyD88-deficient mice infected with *Leishmania* major are interleukin-4 dependent. **Infect. Immun**. p. 717215-7218, 2003.

DEDET, J.P.; Pratlong, F. Protozoa infection. In: Cook, G., Zumla, A. (Eds.), **Manson's Tropical Diseases**. Saunders, Philadelphia, p. 1341–1367, 2009.

DEL VECCHIO, M., BAJETTA, E., CANOVA, S., LOTZE, M.T., WESA, A., PARMIANI, G., ANICHINI, A. Interleukin-12: biological properties and clinical application. **Clin Cancer Res**, v. 13, p. 4677-85, 2007.

DENKERS, E.Y., BUTCHER, B.A. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. **Trends Parasitol**, v. 21, p. 35–41, 2005.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: Epidemiology and public health aspects. **World Health Stat. Q.** v. 45, p. 312, 1992.

DESJEUX, P. The Increase in Risk Factors for the Leishmaniasis **Worldwide Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, p. 95239–43, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis**, v. 27, p. 305–318, 2004.

DOLAI, S., YADAV, R. K., PAL, S., ADAK, S. Overexpression of mitochondrial Leishmania major ascorbate peroxidase enhances tolerance to oxidative stress-induced programmed cell death and protein damage. **Eukaryotic cell**. v.8, p.1721-1731, 2009.

ETTINGER, N.A., DUGGAL, P., BRAZ, R.F., NASCIMENTO, E.T., BEATY, T.H., JERONIMO, S.M., PEARSON, R.D., BLACKWELL, J.M., MORENO, L., WILSON, M.E. Genetic admixture in Brazilians exposed to infection with *Leishmania chagasi*. **Ann Hum Genet**, v. 73, p. 304-13, 2009.

EVANS, T.G., TEIXEIRA, M.J., MCAULIFFE, I.T., VASCONCELOS, I., VASCONCELOS, A.W., SOUSA, A.Q., LIMA, J. W., PEARSON, R.D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **J. Infect. Dis**. v. 166, p. 1124-1132, 1992.

FARROW, A.L., RANA, T., MITTAL, M.K., MISRA, S.; CHAUDHURI, G. Leishmania-induced repression of selected non-coding RNA genes containing B-box element at their promoters in alternatively polarized M2 macrophages. **Mol Cell Biochem**, v. 350, p. 47–57, 2011.

FERRIC, C.F. Mechanisms of Nitric Oxide-related Antimicrobial Activity. **Am. Soc. Clin. Invest.**, v. 99, p. 2818-2825, 1997.

FINK, S.L. AND COOKSON, B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infect Immun**, v. 73, v. 1907-1916, 2005.

FLANDIN, J.F., CHANO, F., DESCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. **Eur J Immunol**, v. 36, p. 411–420, 2006.

FOULDS, K.E., WU, C.Y., SEDER, R.A. Th1 memory: implications for vaccine development. **Immunol Rev**, v. 211, p. 58-66, 2006.

GAMA, M.E.A., COSTA, J.M.L., PEREIRA, J.C.R., GOMES C.M.C., CORBETT, C.E.P. Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 1, p. 37, 2004.

GHALIB, H., PIUVEZAM, M., SKEIKY, Y. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **J Clin Invest**, v. 92, p. 324-329, 1993.

GHOSHAL, A., GERWIG, G., KAMERLING, J. P., MANDAL, C. Sialic acids in different *Leishmania* sp., its correlation with nitric oxide resistance and host responses. **Glycobiology**, v. 20, p.553-566, 2010.

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.

GREEN, S.J., SCHELLER, L.F., MARLETTA, M.A., SEGUIN, M.C., KLOTZ, F.W., SLAYTER, M., NELSON, B.J., NACY, C.A. Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. **Immunol. Lett.**, v. 43, p. 87-94, 1994.

GREENE, C.E. et al. Leishmaniasis. In: Infectious diseases of the dog and cat. 3ª edição. St. Louis: **Saunders Elsevier**, v. 73, p.685-697, 2006.

GREGORY, C.D., DEVITT, A. **Immunology**, v. 1, p.113, 2004.

GREGORY, D.J., OLIVIER, M. Subversion of host cell signaling by the protozoan parasite *Leishmania*. **Parasitology**, v. 130, p. S27–S35, 2005.

GUMY, A., LOUIS, J.A., LAUNOIS, P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in The cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. **Int J Parasitol**, v. 34, p. 433-44, 2004.

HANDMAN, E., BULLEN, D.V. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitol**, v. 18, p. 332–334, 2002.

HEINZEL, F.P., SADICK, M. D., MUTHA, S. S., LOCKSLEY, R. M. 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.** v.8, p.7011-7015, 1991.

HOLADAY, B.J., Pompeu, M.M., Jeronimo, S., Texeira, M.J., Sousa, A.Q., Vasconcelos, A.W., Pearson, R.D., Abrams, J.S., Locksley, R.M. Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kala azar. **J Clin Invest**, v. 92, p. 2626-2632, 1993.

HOLADAY, B.J. Immunotherapy for visceral leishmaniasis: Ability of factors produced during anti-leishmania responses of skin test positive adults to inhibit peripheral blood mononuclear cell activities associated with visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 55-66, 1999.

JANEWAY, C.A. JR. How the immune system protects the host from infection. **Microbes Infect.** v. 3, p. 1167-71, 2001.

JERONIMO, S.M.B., et al. Natural history of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* infection in Northeastern Brazil: long-term follow-up. **Clin Infect Dis.** v. 30, p. 608–609, 2000.

JERONIMO SMB, et al. Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: a genomewide scan. **J Infect Dis.** v. 196, p. 1261–1269, 2007.

JORENS, P.G., MATTHYS, K.E., BULT, H. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. **Med. Inflamm.**, v. 4, p. 75-89, 1995.

KARPLUS, T.M., JERÔNIMO, S.M., CHANG, H., HELMS, B.K., BURNS, T.L., MURRAY, J.C. et al. Association between the tumor necrosis factor locus and the clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. **Infect. Immun.**, v.70, n.12, p. 6919-6925, 2002.

KAVOOSI, G., ARDESTANI, S. K., KARIMINIA, A. "The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs)," **Parasitology**, v. 136, n. 10, p. 1193–1199, 2009.

KAWAI, T., AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat Immunol**, v. 11, p. 373-384, 2010.

KHARAZMI, A., KEMP, K., ISMAIL, A., GASIM, S., GAAFAR, A., KURTZHALS, J. A. et al. T-cell response in human leishmaniasis. **Immunol Lett.** v.65, p.105-108, 1999.

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.

KRYSKO, D.V., D'HERDE, K., VANDENABEELE, P. **Apoptosis**, v. 11, p. 1709, 2006.

KUIDA. K.. LIPPKE. J.A.. KU. G.. HARDING. M.W.. LIVINGSTON. D.J.. SU. M.S. AND FLAVELL. R.A. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. **Science**, v. 267, v. 2000-2003, 1995.

KURTZHALS, J.A.L., HEY, A., THEANDER, T.G. et al. Cellular and humoral immune reactivity of a population in Baringo District, Kenya, to *Leishmania* promastigote lipophosphoglycan. **Am. f. Trop. Med. Hyg.** v. 46, p. 480–488, 1992.

LAINSON, R., SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W., Killick-Kendrich, R. 2ª edição. The leishmaniasis in biology and medicine. London: **Academic Press**. p.1-121, 1987.

LAINSON, R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 321, p. 389-404, 1988.

LAINSON, R. Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. In M Service, Demographic and Vector Borne Disease, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 85-106, 1989.

LAMKANFI, M., AMER, A., KANNEGANTI, T.D., MUNOZ-PLANILLO, R., CHEN, G., VANDENABEELE, P. et al. The Nod-like receptor family member Naip5/Bircle restricts Legionella pneumophila growth independently of caspase-1 activation. **J Immunol**, v. 178, p. 8022-8027, 2007.

LEE, S.H., STARKEY, P.M., GORDON, S. Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. **J Exp Med**, v. 161, p. 475-89, 1985.

LIMA, G.M.A.C., VALLOCHI, A.L., SILVA, U.R., BEVILACQUA, E.M.A.F., KIFFER, M.M.F., ABRAHAMSOHN, I.A. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. **Immunol Lett**, v. 64, p. 145-151, 1998.

LODGE, R., DIALLO, T.O., DESCOTEAUX, A. Leishmania donovani lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. **Cell Microbiol**, v. 8, p. 1922-1931, 2006.

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.

MARTINEZ-SALAZAR, B., BERZUNZA-CRUZ, M., BECKER, I. Leishmania mexicana DNA activates murine macrophages and increases their TLR9 expression. **Gac Med Mex.**, v.144, p.99-104, 2008.

MAUEL, J., RANSIJN, A. Leishmania spp.: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. **Exp. Parasitol.** v. 87, p. 98-111, 1997.

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

MCCONVILLE, M.J., HANDMAN, E. The molecular basis of Leishmania pathogenesis. **Int J Parasitol**, v. 37, p.1047-51, 2007.

MCNEELY, T. B., TURCO, S. J. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. **J. Immunol.** v. 144, p. 2745–2750, 1990.

MISRA, S., TRIPATHI, M.K., CHAUDHURI, G. Down-regulation of 7SL RNA expression and impairment of vesicular protein transport pathways by *Leishmania* infection of macrophages. **J Biol Chem**, v. 280, p. 29364–29373, 2005.

MOSMANN, T.R., CHERWINSKI, H., BOND, M.W., GIEDDLIN, M.A., COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol**, v. 136, p. 2348-57, 1986.

MOSSER, D.M., EDELSON, P.J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. **J Immunol.**, v.135, p.2785–2789, 1985.

MOSSER, D.M., VLASSARA, H., EDELSON, P.J., CERAMI, A. *Leishmania* promastigotes are recognized by the macrophage receptor for advanced glycosylation endproducts. **J Exp Med.**, v.165, p.140–145, 1987.

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.

MUKHOPADHYAY, S., DDEMANN, A.P., HOE, J.C., WILLIAMS, K.J., VARIN, A., MAKEPEACE, K., AKNIN, M., BOWDISH, D.M.E., SMALE, S.T., BARCLAY, A.N., GORDON, S. Immune Inhibitory Ligand CD200 Induction by TLRs and NLRs Limits Macrophage Activation to Protect the Host from Meningococcal Septicemia. **Cell Host & Microbe** 8, p. 236–247, 2010.

MÜLLER, K., BISCHOF, S., SOMMER, F., LOHOFF, M., SOLBACH, W., LASKAY, T. Differential production of macrophage inflammatory protein 1gamma (MIP-1gamma), lymphotactin, and MIP-2 by CD4(+) Th subsets polarized in vitro and in vivo. **Infect Immun**, v. 71, p. 6178–6183, 2003.

MULLER, K., VAN ZANDBERGEN, G., HANSEN, B., LAUFS, H., JAHNKE, N., SOLBACH, W., LASKAY, T. Chemokines, natural killer and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Med Microbiol Immunol**, v. 190, p. 73-76, 2001.

NADERER, T., MCCONVILLE, M.J. The *Leishmania*-macrophage interaction : a metabolic perspective. **Cell Microbiol.** v. 10, p. 301 – 308, 2008.

NETEA, M. G., SUTMULLER, R., HERMANN, C., VAN DER GRAAF, C. A. A., VAN DER MEER, J. W. M., VAN KRIEKE, J. H., HARTUNG, T., ADEMA, G., KULBERG, B. J. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 172, n. 6, p. 3712-3718, 2004.

NYLEN, S., MAASHO, K., SODERSTROM, K., ILG, T., AKUFFO, H. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. **Clin Exp Immunol**, v. 131, p. 457-467, 2003.

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

O'GARRA, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. **Immunity**, v. 8, p. 275–283, 1998.

OLIVIER, M., GREGORY, D.J., FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, p. 293–305, 2005.

OLIVIER, M., GREGORY, D.J., FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, p. 293–305, 2005.

PEARSON, R.D., SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.** v. 22, p. 1–13, 1996.

PETERS, N.C., EGEN, J.G., SECUNDINO, N.S., et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, Washington, v. 321, n. 5891, p. 971- 974, 2008.

PLEWES, K.A., BARR, S. D., GEDAMU, L. Iron superoxide dismutases targeted to the glycosomes of *Leishmania chagasi* are important for survival, Infection and Immunity. v.71, p.5910-5920, 2003.

PRATES, D.B., ARAÚJO-SANTOS, T., BRODSKYN., C., BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A., BORGES, V.M. New Insights on the Inflammatory Role of *Lutzomyia longipalpis* Saliva in Leishmaniasis. *Journal of Parasitology Research*. Volume 2012, Article ID 643029, 11 pages.

PRICE, R.E., TEMPLETON, J.W., SMITH, R. et al. Ability of mononuclear phagocytes from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis to control in vitro intracellular survival of *Brucella abortus*. **Infect. Immun.**, v.58, n.4, p.879-86, 1990.

PROUDFOOT, L., NIKOLAEV, A.V., FENG, G.J., WEI, W.Q., FERGUSON, M.A., BRIMACOMBE, J.S., et al. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and

leishmanicidal activity by glycoconjugates of Leishmania lipophosphoglycan in murine macrophages. **Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.** v. 93, p. 10984–10989, 1996.

PROUDFOOT, L., SCHNEIDER, P., FERGUSON, M.A., MCCONVILLE, M.J. Biosynthesis of the glycolipid anchor of lipophosphoglycan and the structurally related glycoinositolphospholipids from Leishmania major. **Biochem. J.** 308 (Pt 1), p. 45–55, 1995.

RIBEIRO-DE-JESUS, A., ALMEIDA, R.P., LESSA, H., BACELLAR, O., CARVALHO, E.M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 31, p. 143-148, 1998.

RITTER, U. et al. The control of Leishmania (Leishmania) major by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. **Microbes and infection**, Paris, v. 6, p. 559–565, 2004.

RITTIG, M.G., BOGDAN, C. Leishmania – Host-Cell interaction: Complexities and alternative views. **Parasitol Today**, v. 16, p. 292-297, 2000.

ROGERS, K.A., DEKREY, G.K., MBOW, M.L., GILLESPIE, R.D., BRODSKYN, C.I., TITUS, R.G. Type 1 and type 2 responses to Leishmania major. **FEMS Microbiol Lett**, v. 209, p. 1-7, 2002.

SACKS, D., SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunol** v. 3, p. 1041-1047, 2002.

SACKS, D.L., LAL, S.L., SHRIVASTAVA, S.N., BLACKWELL, J., NEVA, F. A. An analysis of T cell responsiveness in India kala-azar. **Journal of Immunology**, v. 138, p. 908-913, 1987.

SANTOS, P.L., COSTA, R.V., BRAZ, J.M., SANTOS, L.F.V.C., BATISTA, A. C., VASCONCELOS, C. R. O., RANGEL, M. R., RIBEIRO DE JESUS, A., DE 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 in Brazil. **Nitric Oxide**, Accepted in 2012.

SCHARTON, T.M., SCOTT, P. Natural killer cells are source of interferon- γ that drives differentiation of CD4⁺ subsets and induces early resistance to Leishmania major in mice. **J Exp Med**, v. 178, p. 567-577, 1993.

SCHARTON-KERSTEN, T.M., AFONSO, L.C., WYSOCKA, M., TRINCHIERI, G., SCOTT, P. IL-12 is required for natural killer-cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. **J Immunol**, v. 154, p. 5320- 5330, 1995.

SCHARTON-KERSTEN, T.M., SHER, A. Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infections. **Curr Opin Immunol**, v. 9, p. 44-51, 1997.

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.

SINAN. Ministério de Saúde
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_casos_05_09_11.pdf> Acessado em 06/10/11.

SINGH, R.K., PANDEY, H.P., SUNDAR, S. Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. **Indian J. Med. Res.** v, 123, p. 331–344, 2006.

SOUZA, A.S., GIUDICE, A., PEREIRA, J.M.B., GUIMARÃES, L.H., DE JESUS, A.R., DE MOURA, T.R., WILSON, M.E., CARVALHO, E.M., ALMEIDA, R.P. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF- α production. **BMC Infect Dis.** v. 10, p. 209, 2010.

SWAIN, S.L. IL-4 dictates T-cell differentiation. **Res Immunol**, v. 144, p. 616-20, 1993.

THOMSON, L., DENICOLA, A., RADI, R. The trypanothione–thiol system in *Trypanosoma cruzi* as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 412, p. 55–64, 2003.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. **Annu Rev Immunol**, v. 13, p. 251-76, 1995.

VAN ZANDBERGEN, G., SOLBACH, W., LASKAY, T. **Autoimmunity**, v. 40, p. 349, 2007.

WANG, Y., XIAO, J., SUZEK, T. O., ZHANG, J., WANG, J., BRYANT, S. H. PubChem: a public information system for analyzing bioactivities of small molecules. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 623–633, 2009.

WEINBERG, J.B., MISUKONIS, M.A., SHAMI, P.J., MASON, S.N., SAULS, D.L., DITTMAN, W.A., WOOD, E.R.L., SMITH, G.K., MACDONALD, B., BACHUS, K.E., HANEY, A.F., GRANGER, D.L. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): Analysis of iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. **Blood** 86(3), p. 1185-1195, 1995.

WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis. Geneva, p. 22-26 mar, 2010.

WHO. The World Health Report [online]
<http://www.who.int/whr/2002/en/whr02_en.pdf> (WHO, Geneva, Switzerland, 2002).

WILSON, M.E., PEARSON, R.D. Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. **J Immunol.** v. 136, p. 4681–4688, 1986.

WYLER, D.J., SYPEK, J.P., MCDONALD, J.A. In vitro parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis: possible role of fibronectin in parasite attachment. **Infect Immun.**, v.49, p.305–311, 1985.

ZAMBRANO-VILLA, S., ROSALES-BORJAS, D., CARRERO, J.C., ORTIZ-ORTIZ, L. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends Parasitol.** v. 18, p. 272-8, 2002.