



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE MONÓCITOS/MACRÓFAGOS  
NA LEISHMANIOSE DISSEMINADA CAUSADA POR *L.*  
*braziliensis***

**Michael Nascimento Macedo**

**Dissertação de Mestrado**

**Salvador (Bahia), 2015**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca  
Universitária de Saúde, SIBI - UFBA.

M141 Macedo, Michael Nascimento

Avaliação do papel de monócitos/macrófagos na patogênese  
da leishmaniose disseminada causada por *L. braziliensis* /  
Michael Nascimento Macedo. – Salvador, 2015.

168 f.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Olívia Amado Ramos  
Bacellar.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.  
Faculdade de Medicina da Bahia, 2015.

1. Leishmania Braziliensis. 2. Leishmaniose Tegumentar.  
3. Monócitos. 4. Macrófagos. I. Bacellar, Olívia Amado Ramos.  
II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.928.5



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE MONÓCITOS/MACRÓFAGOS  
NA LEISHMANIOSE DISSEMINADA CAUSADA POR *L.*  
*braziliensis***

**Michael Nascimento Macedo**  
**Orientadora: Maria Olívia Amado Ramos Bacellar**

**Dissertação apresentada ao colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, da área de concentração em imunologia e Doenças Infecciosas.**

**Salvador (Bahia), 2015**

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

### **MEMBROS TITULARES:**

- Paulo Roberto Lima Machado, professor do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPgCS-UFBA) da faculdade de medicina da Universidade Federal da Bahia e professor adjunto da Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública. Pesquisador associado do Serviço de Imunologia da Universidade Federal da Bahia (SIM/HUPES-UFBA).

- Roque Pacheco de Almeida, professor adjunto da Universidade Federal de Sergipe. Pesquisador do laboratório de biologia molecular do Hospital Universitário da UFS.

- Valéria de Matos Borges, professora permanente do Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental (PGPAT). Pesquisadora do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM-FIOCRUZ).

### **MEMBROS SUPLENTE**

- Maria Olívia Amado Ramos Bacellar (professora-orientadora), professora do programa de Pós-graduação em Imunologia (PPGIIm/UFBA) e do programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPgCS/UFBA), pesquisadora associada do Serviço de Imunologia (SIM) do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (COM-HUPES/UFBA).

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

- National Institute of Health (NIH) - AI-30639-20;
- Bolsa de estudos: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

" Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida. "

Carl Sagan

Dedico este trabalho aos meus pais Erivaldo e Joselita e irmã Karen. Muito obrigado por todo o amor e apoio transmitidos ao longo de toda esta jornada. O amor de vocês faz toda a diferença.

A minha orientadora Olívia Bacellar. Muito obrigado pela oportunidade e inspiração. Obrigado por ser um exemplo de profissionalismo e ética.

A todos os pacientes acometidos pela leishmaniose, afinal toda essa dedicação visa a sua melhoria de vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Dra. Olívia Bacellar, por toda a dedicação e paciência, e por permitir o meu ingresso no Serviço de Imunologia (SIM/HUPES-UFBA).

Ao Dr. Edgar Carvalho, pela grande contribuição científica e por sempre se colocar à disposição em todos os momentos.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunorregulação (SIM/HUPES-UFBA): Aline Muniz, Jacilara Alexandrino, Pedro Carneiro, Thiago Cardoso.

Ao Dr. Thiago Cardoso, por todo o suporte e atenção desde os meus primeiros momentos no Serviço de Imunologia. Agradeço também pela amizade e confiança.

Aline Muniz, por todos esses anos de amizade construída no Serviço de Imunologia.

A Dra. Natália Carvalho, pela amizade e apoio.

A Dra. Andrea Magalhães, Dra. Ângela Giudice, Juliana Almeida, Viviane Andrade, Rúbia Costa e a todos demais colaboradores do Serviço de Imunologia.

Aos médicos Dr. Paulo Machado e Luiz Guimarães e aos demais profissionais da área médica pelo grande trabalho realizado na área endêmica de Corte de Pedra.

A Ednaldo Lago, por todo o suporte na área endêmica de Corte de Pedra.

A todos os profissionais do Serviço de Imunologia.

A todos aqueles que atuam no Centro de Referência em Leishmaniose – Dr. Jackson Costa.



A Dra Vera Vinhas, pelos conselhos, oportunidades e todo o incentivo.

Aos meus amigos Ana Pinheiro, Carolina Cincurá, Douglas Moreira, Famiely Colman, Ila Muniz e Jurema Cunha.

Ao meu amigo Yuri Tabajara pela amizade e pelos bons momentos de discussão científica e descontração.

Ao Dr. Eustáquio Borges pela amizade, contribuições e incentivo durante todos esses anos.

A Dra Melisa Gualdrón-Lopez, pelo incentivo e encorajamento, e pelos bons momentos de descontração.

Meus sinceros agradecimentos a todos os membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta e indireta, mas que por ventura não puderam ser citados aqui.

## ÍNDICE

LISTA DA ABREVIATURAS E SIGLAS .....	12
LISTA DE TABELAS .....	14
LISTA DE FIGURAS .....	15
I. RESUMO .....	16
II. OBJETIVOS .....	17
III. INTRODUÇÃO.....	18
IV. REFERENCIAL TEÓRICO .....	21
IV. 1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA .....	21
IV. 2. AGENTE ETIOLÓGICO E TRANSMISSÃO.....	24
IV. 3. ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR .....	26
IV. 4. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA .....	28
IV. 5. O PAPEL DA RESPOSTA IMUNE INATA NO CONTROLE DA INFECÇÃO POR <i>LEISHMANIA</i> .....	31
IV. 6. MECANISMOS OXIDATIVOS ENVOLVIDOS NA MORTE DA <i>LEISHMANIA</i> .....	34
IV. 7. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO .....	36
IV. 8. ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO.....	37
V. HIPÓTESE.....	39
VI. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS .....	40
V. 1. ÁREA ENDÊMICA DE CORTE DE PEDRA.....	40
V. 2. DESENHO DE ESTUDO .....	41
V.3. DEFINIÇÃO DE CASOS .....	41
V. 4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	43
V. 5. CRITÉRIO DE NÃO-INCLUSÃO .....	43
V. 6. ASPECTOS ÉTICOS .....	43
V. 7. METODOLOGIA .....	44
ARTIGO .....	55
VI. RESULTADOS.....	94
VI. 1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	94
VI. 2. AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE INFECÇÃO E DE CARGA PARASITÁRIA EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE	

DISSEMINADA APÓS INFECÇÃO COM <i>L. braziliensis</i> .....	96
VI. 3. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DA <i>L. braziliensis</i> EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LD INFECTADOS COM O PARASITO .....	100
VI. 4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO BURST OXIDATIVO EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LD POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	104
VI. 5. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO BURST OXIDATIVO APÓS INIBIÇÃO DA ENZIMA NADPH OXIDASE E NOS SINTETASE EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LD APÓS A INFECÇÃO COM <i>L. braziliensis</i> .....	108
VI. 6. AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE INFECÇÃO E DA CARGA PARASITÁRIA DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM LD INFECTADOS COM <i>L.</i> <i>braziliensis</i> APÓS A INIBIÇÃO DAS ENZIMAS NADPH OXIDASE E NOS SINTETASE .....	112
VI. 7. AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS MACRÓFAGOS NA PATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE DISSEMINADA .....	116
VI. 8. CORRELAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) E NÚMERO DE LESÕES EM PACIENTES COM LD.....	120
VI. 9. CORRELAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DO BURST OXIDATIVO E O NÚMERO DE LESÕES EM PACIENTES COM LD .....	123
VI. 10. CORRELAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS DE PACIENTES COM LD INFECTADOS COM <i>L. braziliensis</i> E NÚMERO DE LESÕES .....	125
VII. DISCUSSÃO .....	127
VIII. SUMÁRIO DE RESULTADOS .....	136
XI. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	138
X. CONCLUSÕES .....	139
XI. SUMMARY .....	140
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	141
XIII. ANEXOS .....	157

## LISTA DA ABREVIATURAS E SIGLAS

CCL2	Quimiocina (C-C motivo) ligante 2
CCL3	Quimiocina (C-C motivo) ligante 3
CCL11	Quimiocina (C-C motivo) ligante 11
CD14	Grupamento de diferenciação 14
CD16	Grupamento de diferenciação 16
CR1	Receptor do complemento 1
CR3	Receptor do complemento 3
CXCL9	Quimiocina (C-X-C motivo) ligante 9
CXCL10	Quimiocina (C-X-C motivo) ligante 10
DHR-123	Dihidrorodamina - 123
DPI	Cloreto difeniliodonio
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL-10	Interleucina - 10
L-NMMA	L - N <sup>G</sup> - Citrato monometílico arginina
LBB	<i>Leishmania braziliensis</i>
LPG	Lipofosfoglicano
MFI	Média de intensidade de fluorescência
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SLA	Antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>
SOD	Superóxido dismutase
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PMA	Phorbol miristato acetato
CD4+	Grupamento de diferenciação 4
CD8+	Grupamento de diferenciação 8
TLR4	Toll like receptor 4
TLR2	Toll like receptor 2
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2

TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TNF	Fator de necrose tumoral

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b>	Aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos dos pacientes com leishmaniose disseminada	94.
------------------	--	-----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Localização da região de Corte de Pedra-BA	40
<b>Figura 2.</b>	Representação da caracterização fenotípica de monócitos clássicos CD14 após separação das PBMCs e marcação com anticorpos anti-CD14 (PerCP/Cy5.5) e anti-CD16 (PE).	47
<b>Figura 3.</b>	Representação gráfica da análise da expressão do burst oxidativo em monócitos do sangue periférico	52
<b>Figura 4.</b>	Avaliação da suscetibilidade de monócitos de pacientes com LD à infecção com <i>L. braziliensis</i>	97
<b>Figura 5.</b>	Avaliação da suscetibilidade de monócitos de pacientes com LD e LC à infecção com <i>L. braziliensis</i>	99
<b>Figura 6.</b>	Avaliação da viabilidade da <i>L. braziliensis</i> em cultura de monócitos de pacientes com LD infectados com o parasito	101
<b>Figura 7.</b>	Avaliação da viabilidade da <i>L. braziliensis</i> em cultura monócitos de pacientes com LD infectados com o parasito	103
<b>Figura 8.</b>	Avaliação da expressão do Burst Oxidativo em monócitos de pacientes com LD por citometria de fluxo	105
<b>Figura 9.</b>	Expressão do burst oxidativo em monócitos de pacientes com LD e LC após a infecção com <i>L. braziliensis</i> por citometria de fluxo	107
<b>Figura 10.</b>	Expressão do burst oxidativo após inibição da enzima NADPH oxidase e NOS sintetase em monócitos de pacientes com LD após a infecção com <i>L. braziliensis</i>	109
<b>Figura 11.</b>	Expressão do burst oxidativo após inibição da enzima NADPH oxidase e NOS Sintetase em monócitos de pacientes com LD e LC após a infecção com <i>L. braziliensis</i>	111
<b>Figura 12.</b>	Avaliação do percentual de infecção e da carga parasitária de monócitos de pacientes com LD infectados com <i>L. braziliensis</i> após a inibição das enzimas NADPH oxidase e NOS sintetase	113
<b>Figura 13.</b>	Avaliação do percentual de infecção e da carga parasitária de monócitos de pacientes com LD e LC infectados com <i>L. braziliensis</i> após a inibição das enzimas NADPH oxidase e NOS sintetase	115
<b>Figura 14.</b>	Avaliação da infecção e da carga parasitária em macrófagos de pacientes com LD e LC após a infecção por <i>L. braziliensis</i>	117
<b>Figura 15.</b>	Avaliação da produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos de pacientes com LD e LC após a infecção por <i>L. braziliensis</i>	119
<b>Figura 16.</b>	Correlação entre a produção de citocinas produzidas por PBMCs e o número de lesões de pacientes com leishmaniose disseminada	122
<b>Figura 17.</b>	Correlação entre a produção do burst oxidativo e o número de lesões de pacientes com leishmaniose disseminada	124
<b>Figura 18.</b>	Correlação entre a produção de citocinas produzidas por macrófagos de pacientes com LD infectados com <i>L. braziliensis</i> e o número de lesões observado	126

## I. RESUMO

### **AVALIAÇÃO DO PAPEL DE MONÓCITOS/MACRÓFAGOS NA PATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE DISSEMINADA CAUSADA POR *L. braziliensis***

**Introdução:** A leishmaniose disseminada (LD) é uma forma emergente da infecção causada por *Leishmania braziliensis*, caracterizada por múltiplas lesões cutâneas em diferentes partes do corpo. Os mecanismos que permitem a disseminação do parasito na LD ainda não estão bem esclarecidos. Monócitos/macrófagos tem um papel importante na resposta imune inata e o controle inicial da infecção por *Leishmania* tem sido relacionado com a ativação de macrófagos e a morte dos parasitos. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que os macrófagos também participam da patogênese da leishmaniose cutânea (LC). A hipótese deste estudo é de que monócitos/macrófagos de pacientes com LD são mais susceptíveis à infecção por *L. braziliensis* contribuindo para a disseminação da doença e produzem mais moléculas inflamatórias do que monócitos/macrófagos de pacientes com LC. **O objetivo** deste estudo foi caracterizar o comportamento de monócitos/macrófagos de pacientes com LD após a infecção com *L. braziliensis*. **Material e métodos e Resultados:** Monócitos do sangue periférico e macrófagos derivados de monócitos de pacientes com LD e LC foram infectados com *L. braziliensis* na proporção de 5:1 em diferentes períodos. O número de monócitos infectados e a carga parasitária foram determinados por microscopia óptica. A viabilidade das promastigotas foi avaliada através da contabilização das promastigotas móveis após três dias em meio de cultura Schneider. A determinação do burst oxidativo foi realizada através da oxidação da Dihidrorodamina 123 e avaliado por citometria de fluxo. A produção de citocinas/quimiocinas foi avaliada através de ensaio imunoenzimático (ELISA). **Resultados:** Monócitos de pacientes com LD apresentaram um menor percentual de infecção e de carga parasitária nos últimos períodos de infecção quando comparados com os monócitos de pacientes com LC. Entretanto o número de parasitos viáveis nos sobrenadantes de culturas de monócitos após 72 horas foi maior nos pacientes com LD quando comparado com pacientes com LC. A produção do burst oxidativo após a infecção com *L. braziliensis* foi menor em monócitos de pacientes com LD comparados com monócitos de pacientes com LC. Entretanto, a produção de TNF, CXCL9 e CXCL10 foi maior em culturas de macrófagos de pacientes com LD. Foi observada uma forte correlação entre a produção de TNF por macrófagos e o número de lesões nos pacientes com LD. **Conclusão:** A proliferação de *L. braziliensis* em pacientes com leishmaniose disseminada está provavelmente associada com a baixa produção do burst oxidativo e as elevadas concentrações de moléculas inflamatórias produzidas por macrófagos de pacientes com LD podem contribuir para a patogênese da doença.

**Palavras-chave:** Leishmaniose disseminada, *Leishmania braziliensis*, Monócitos/macrófagos, Quimiocinas.



## **II. OBJETIVOS**

### **II.1 OBJETIVO GERAL**

Caracterizar a infecção por *Leishmania braziliensis* dos monócitos e macrófagos do sangue periférico de pacientes com leishmaniose disseminada e leishmaniose cutânea.

### **II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Avaliar e comparar a suscetibilidade de monócitos e macrófagos de pacientes com leishmaniose disseminada (LD) e leishmaniose cutânea (LC) à infecção com *L. braziliensis*.
2. Avaliar e comparar a expressão do burst oxidativo em monócitos de pacientes com LD e LC após infecção com *L. braziliensis*.
3. Avaliar e comparar a produção de CCL2, CXCL9 e CXCL10 e TNF por macrófagos de pacientes com LD e LC após infecção com *L. braziliensis*.

### III. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias vetores-dependentes, cujo agente etiológico é o protozoário do gênero *Leishmania* (Família Trypanosomatidae). A infecção por *Leishmania spp.* resulta em um amplo espectro clínico, que pode ser classificado em duas formas principais: a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV). No Novo Mundo a forma clínica predominante é a leishmaniose tegumentar americana (LTA) que se manifesta clinicamente sob quatro formas distintas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose disseminada (LD) e a leishmaniose cutânea difusa (LCD). Nas Américas, atualmente são reconhecidas 11 espécies de *Leishmania* causadoras de doença tegumentar humana. No Brasil, as principais espécies são: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania amazonensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Dentre todas as formas clínicas observadas na LTA, a LC é considerada a mais comum e benigna. Estima-se que aproximadamente 3% dos indivíduos que desenvolvem a forma cutânea podem desenvolver a forma mucosa da doença (JONES et al., 1987). A forma cutânea difusa é uma forma rara da doença, sendo diagnosticada de um a dois casos por ano em todo o Brasil. Em algumas áreas endêmicas, aproximadamente 10% dos indivíduos possuem reação de Montenegro positiva (reação de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania*), entretanto estes não desenvolvem a doença. Esses indivíduos são considerados como tendo uma infecção subclínica (SC) da doença (FOLLADOR et

al., 2002; SCHNOOR *et al.*, 2012). Uma forma emergente da doença, a leishmaniose disseminada, se diferencia das outras formas por sua peculiaridade clínica e imunológica. Em alguns estudos prévios os casos de LCD eram confundidos com a LD por sua semelhança clínica. Os estudos realizados com LD ajudaram a discriminar estas duas formas clínicas (CARVALHO *et al.*, 1994; TURETZ *et al.*,2002).

A leishmaniose disseminada, causada principalmente por *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (CARVALHO *et al.*, 1994) é mais comumente observada no nordeste brasileiro, mais especificamente na área endêmica de Corte de Pedra, na Bahia, local onde se observa quase todos os casos de leishmaniose disseminada do país (CARVALHO *et al.*, 1994; TURETZ *et al.*, 2002), havendo apenas alguns relatos de casos isolados em outros estados (GALVÃO *et al.*, 1993; VIEIRA-GONÇALVES *et al.*, 2008). Nessa forma da doença os pacientes podem apresentar até 800 lesões (papulares, acneiformes e ulceradas) distribuídas em duas ou mais partes do corpo e com uma alta frequência de envolvimento da mucosa (CARVALHO *et al.*, 1994; TURETZ *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2011). Os pacientes com leishmaniose disseminada apresentam sintomas gerais como febre, calafrios, fraqueza e mal-estar na primeira semana do aparecimento da lesão, sintomas esses que não são observados em nenhuma outra forma de leishmaniose tegumentar. Embora os mecanismos relacionados à disseminação da doença não sejam conhecidos, a disseminação rápida e a ocorrência de sintomas sistêmicos sugerem disseminação hematogênica (CARVALHO *et al.*,1994).

Enquanto que nos modelos experimentais de leishmaniose a resposta do tipo Th1 é relacionada com o controle da infecção, na leishmaniose tegumentar humana, a resposta Th1 exacerbada e não modulada está mais relacionada com a patogênese da doença do que com a proteção (BACELLAR et al., 2002; ANTONELLI et al., 2005). Ao passo que a resposta imunológica na LC e LM é caracterizada por altas concentrações de IFN- $\gamma$  e de TNF- $\alpha$  e também baixa produção de citocinas regulatórias como IL-10 (BACELLAR et al., 2002), a resposta na leishmaniose disseminada ainda não está muito bem esclarecida. Alguns dos poucos estudos realizados no tema apontam que estes pacientes apresentam uma resposta imune celular ao antígeno de *Leishmania in vitro* com uma produção de IFN- $\gamma$  e de TNF- $\alpha$  significativamente menor que a produção observada em pacientes com LC (TURETZ et al., 2002; MACHADO et al., 2011). Em adição, a avaliação *in situ* de citocinas demonstrou não haver diferença estatisticamente relevante na produção de TGF- $\beta$ , CCL2, CCL3, CCL11 e CXCL10 entre os pacientes com LC e LD. Entretanto, a produção sistêmica de CXCL9, uma quimiocina relacionada com o recrutamento e ativação das células T, foi maior em pacientes com LD quando comparado com a produção observada em pacientes com LC (MACHADO et al., 2011).

Um estudo recente mostrou que os macrófagos podem participar tanto da proteção do hospedeiro, quanto da doença na infecção por *L.braziliensis* (GIUDICE et al., 2012). Nesse estudo foi demonstrado que os macrófagos de indivíduos com infecção subclínica (SC) têm uma maior capacidade de matar a *Leishmania* quando comparado com macrófagos de pacientes com LC e LM. Além disso, a dosagem de quimiocinas no sobrenadante de culturas de macrófagos

infectados com *L. braziliensis* revelou maior produção de moléculas inflamatórias como TNF e CXCL9 por macrófagos de pacientes com LC e LM o que sugere que a produção destas quimiocinas/citocinas durante a resposta imune inata contribui para o desenvolvimento da lesão. Como a resposta imune adaptativa não esclarece os mecanismos de disseminação da doença, é importante também avaliar o papel da resposta imune inata na LD. Neste sentido, o estudo da participação de monócitos/macrófagos que são células importantes nos momentos iniciais da infecção pode contribuir para o entendimento de como estes componentes atuam e qual papel assumem na infecção por *Leishmania*.

#### **IV. REFERENCIAL TEÓRICO**

##### **IV. 1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

As leishmanioses constituem um complexo grupo de doenças de caráter infeccioso causadas por parasitos do gênero *Leishmania*. Os seus altos números de incidência e taxas de mortalidade e dificuldades no manejo fizeram com que a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluísse a leishmaniose entre os seis problemas de saúde de interesse prioritário para a instituição. Atualmente são registrados cerca de 1,6 milhões de novos casos por ano, sendo a leishmaniose

cutânea responsável por 1,2 milhões desses casos (ALVAR et al., 2012). A leishmaniose ainda está presente em 98 países, afetando grande parte do continente americano, Ásia, África, Europa e Oriente Médio (ALVAR et al., 2012).

No Novo Mundo a principal forma da leishmaniose é a leishmaniose tegumentar americana (LTA), que se apresenta sob as formas clínicas: cutânea, mucosa, disseminada e cutânea difusa. A manifestação de cada uma dessas formas dependerá de vários fatores que vão desde fatores relacionados ao hospedeiro, quanto aos intrínsecos do patógeno, além de fatores relacionados ao meio que também exercem papel importante (BRAY et al., 1980).

Desde que o jovem médico Juliano Moreira descreveu em 1895 a existência de um botão endêmico, o primeiro relato de leishmaniose tegumentar americana até então, o Ministério da Saúde só iniciou um programa oficial de controle da LTA nos anos 1980 (MOREIRA et al., 1895). Devido a esta medida o número de notificações anuais saltou de 5.000 para 36.000 em 1995 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Tal fato também pode ser relacionado não somente com o aumento do número de notificações, mas também à invasão do homem às florestas culminando com a sua inserção no ciclo silvestre do parasito.

Atualmente o Ministério da Saúde relata cerca de 30.000 casos de LTA em várias das unidades federativas do país. Contudo, sua maior incidência encontra-se nas regiões norte e nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Uma importante área endêmica de leishmaniose tegumentar encontra-se no estado da Bahia, município de Tancredo Neves a 280 km de Salvador. Nesse local encontra-se o vilarejo de Corte de Pedra, local onde se registra as maiores incidências anuais de leishmaniose tegumentar do Estado, com um aumento importante nos últimos

vingte anos. No ano de 2012 registraram-se 1.814 casos, um aumento de quase 15% em relação ao ano de 2010 (1.556) (JIRMANUS et al., 2012).

A leishmaniose visceral não ocorre nesta região, que é uma área de transmissão de *Leishmania braziliensis*. Embora a *Leishmania amazonensis* ter sido identificada na vila de Corte de Pedra, apenas *L. braziliensis* tem sido isolada nos últimos 15 anos (JIRMANUS et al., 2012). Formas clínicas da infecção por *L. braziliensis* incluem leishmaniose cutânea localizada (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose disseminada (LD). Mais recentemente, as formas atípicas da doença têm sido descritas, tais como lesões verrucosas e múltiplas lesões nodulares em uma área específica do corpo (GUIMARÃES et al., 2009).

Nos últimos anos vem sendo observado um aumento inexplicável no número de casos de pacientes com a forma disseminada, considerada uma das formas mais graves da doença. Enquanto que no passado só eram atribuídos 0,2% do total do número de casos de leishmaniose tegumentar (JONES et al., 1987), nos anos 2000 já se registrava cerca de 2% dos pacientes com leishmaniose tegumentar com a forma disseminada da doença (TURETZ et al., 2002). Apesar de no passado já ter sido confundida com a forma cutânea difusa da doença (LCD), hoje se sabe que são doenças distintas do ponto de vista clínico, imunológico, além de a LCD ser uma doença mais rara, com 1-2 casos registrados a cada ano (COSTA et al., 1992; BOMFIM et al., 1996). Ainda são desconhecidos os fatores que podem estar contribuindo para o aumento do número de casos de pacientes com LD, mas acredita-se que fatores relacionados ao parasito, hospedeiro e ambiente podem favorecer a disseminação da doença pelo corpo (TURETZ et al., 2002; SCHRIEFER et al., 2004; LEOPOLDO et al., 2006; QUEIROZ et al., 2012).

Atualmente discute-se como seria o padrão atual de transmissão da doença já que não é mais necessário a entrada direta do homem no ciclo silvestre do parasito e se tem notado cada vez mais a existência de formas evoluídas em que o homem passou a dividir o papel de reservatório do parasito com os animais, como ocorre no calazar indiano e na LC urbana do Oriente Médio (WHO, 1990). Além disso, também tem sido registrada a presença de diversos surtos em áreas economicamente desenvolvidas, como França e Espanha, por exemplo (ARCE et al., 2013; LACHAUD et al., 2013).

#### IV. 2. AGENTE ETIOLÓGICO E TRANSMISSÃO

A *Leishmania* é um parasito que pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. Nas américas são conhecidas 11 espécies de *Leishmania* causadoras de doença em humanos. No Brasil, as principais responsáveis pela leishmaniose tegumentar americana são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amanozensis* (JONES et al., 1987; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A *Leishmania* infecta naturalmente animais silvestres que ao serem picados por insetos flebotomíneos transmitem o parasito para este hospedeiro invertebrado. Uma vez infectando os insetos vetores, a *Leishmania* sofre transformações bioquímicas no trato digestivo do hospedeiro invertebrado e passa da forma procíclica para a forma metacíclica, forma infectante do parasito. Durante



a metaciclo-gênese a *Leishmania* perde a sua capacidade de adesão ao epitélio do intestino médio do flebótomo. Como consequência, as formas promastigotas metacíclicas migram para a faringe e cavidade bucal do flebótomo, onde permanecem até o próximo repasto sanguíneo do inseto vetor que, de forma concomitante, inocula as promastigotas no hospedeiro invertebrado. Este constitui um importante passo do ponto de vista evolutivo do parasito, pois as mudanças bioquímicas ocorridas durante a metaciclo-gênese na membrana do parasito conferem resistência a um dos primeiros mecanismos inatos de defesa, o sistema complemento (SACKS, PERKINS, 1984; FRANKE et al., 1985; PINTO-DA-SILVA et al., 2002; ROGERS et al., 2002).

A *Leishmania* ainda possui duas fases que estão relacionadas com as suas habilidades e a sua necessidade de adaptação. A fase promastigota é a fase em que a *Leishmania* se encontra na forma alongada e com um flagelo associado à uma estrutura denominada cinetoplasto. Todavia, ao infectar as células do sistema mononuclear fagocítico, especialmente macrófagos, o parasito adquire uma forma arredondada e com um flagelo intracelular, contido na bolsa flagelar. As formas amastigotas do parasito evadem dos mecanismos inatos de defesa e proliferam-se até a ruptura da célula que permite a ida da *Leishmania* para o meio extracelular podendo infectar novas células e disseminar-se pelos tecidos (LAINSON et al., 1987; HEPBURN, 2003).

#### IV. 3. ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A leishmaniose tegumentar no Brasil, causada principalmente pelo protozoário da espécie *L. braziliensis*, apresenta amplo espectro clínico de manifestações, incluindo a leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose disseminada (LD) e a leishmaniose cutânea difusa (LCD) (MARSDEN, 1985, JONES et al., 1987).

A leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença representando 90 a 95% dos casos da LTA e se manifesta com uma ulceração cutânea única, bordas elevadas e granulomatosas (BITTENCOURT, BARRAL, 1991; CARVALHO ET AL., 1995). Na infecção causada pela *L. braziliensis* a fase inicial da doença se caracteriza por pápula ou nódulo seguido de ulceração superficial e adenomegalia regional indolor maior que 3 cm (MACHADO *et al.*, 2002). Cerca de 3% dos pacientes com a LC evoluem para a forma mais grave da doença, a leishmaniose mucosa, que é caracterizada por uma exacerbada imunidade mediada por células e graves lesões de desenvolvimento lento e progressivo que comprometem a região mucosa e submucosa, principalmente o nariz, boca e orofaringe (MARSDEN, 1986; LESSA et al., 2001; BACELLAR et al., 2002;). Em algumas áreas endêmicas, aproximadamente 10% dos indivíduos possuem reação de Montenegro positiva (reação de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania*) e/ou produção de IFN- $\gamma$  antígeno específica, entretanto estes não desenvolvem a doença. Esses indivíduos são considerados como tendo uma infecção subclínica (SC) ou assintomáticos (FOLLADOR et al., 2002; BEN SALAH

et al., 2005; SCHNOOR et al., 2012).

A LD é principalmente observada no nordeste brasileiro, mais especificamente na área endêmica de Corte de Pedra, na Bahia, local onde se observa quase todos os casos de leishmaniose disseminada do país (CARVALHO et al., 1994; TURETZ et al., 2002), havendo apenas alguns relatos de casos isolados em outros estados (GALVÃO et al., 1993; VIEIRA-GONÇALVES et al., 2008). Embora a *Leishmania amazonensis* e a *Leishmania braziliensis* no passado tenham sido reportadas associadas com a leishmaniose disseminada (CARVALHO et al., 1994) atualmente, somente a *L. braziliensis* tem sido associada com essa doença (TURETZ et al., 2002). Ao mesmo tempo, alguns genótipos de *L. braziliensis* foram mais associados com LD em uma área endêmica de LTA (SCHRIEFFER et al., 2009; QUEIROZ et al., 2012).

Na LD os pacientes podem apresentar até 800 lesões (papulares, acneiformes e ulceradas) distribuídas em duas ou mais partes do corpo e com uma alta frequência de envolvimento da mucosa (CARVALHO et al., 1994; TURETZ et al., 2002). Os pacientes com leishmaniose disseminada apresentam sintomas gerais como febre, calafrios, fraqueza e mal-estar na primeira semana do aparecimento da lesão, sintomas esses que não são observados em nenhuma outra forma de leishmaniose tegumentar. Embora os mecanismos relacionados à disseminação da doença não sejam conhecidos, a disseminação rápida e a ocorrência de sintomas sistêmicos sugerem disseminação hematogênica (CARVALHO et al., 1994).

#### IV. 4. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

O entendimento atual da resposta imune na leishmaniose tegumentar muito se deve aos modelos de infecção experimental realizados a partir da década de 1980. Impulsionados pelas descobertas ocorridas acerca de uma nova classificação para os linfócitos T em Th1 e Th2, baseada na produção de citocinas (MOSMANN et al., 1986; MOSMANN et al., 1989), Scott et al. (1988) apresentaram um modelo de infecção experimental murino em que a resistência à infecção foi associada com o polo Th1, com produção de IL-2 e IFN- $\gamma$ , enquanto que a exacerbação e susceptibilidade foi relacionada com a produção de IL-4 e IL-5, característica das células Th2. Contudo, Scott et al. (1988) concordam que uma resposta equilibrada com a presença de citocinas Th1 e Th2 parece ser importante para a resolução da leishmaniose tegumentar (SCOTT et al., 1988).

O modelo mais usual de leishmaniose experimental utiliza duas distintas linhagens de camundongos: C57BL/6 e BALB/C, resistentes e susceptíveis à infecção, respectivamente (SACKS; NOBEN, 2002). Os camundongos C57BL/6, quando infectados com *L. major*, desenvolvem resposta Th1, com produção de IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , associadas com resistência à infecção; enquanto que a infecção de camundongos BALB/C resulta em resposta Th2, caracterizada pela produção de IL-4 e IL-5, evoluindo para lesões inflamatórias e multiplicação do parasito (SCOTT et al., 1988; TAYLOR; MURRAY, 1997). Em relação aos modelos de infecção experimental subcutânea aplicado à *L. braziliensis*, o que se sabe é que a infecção da maior parte dos camundongos não resulta em lesões graves de longa

duração, e evoluem para cura espontânea (CHILDS et al., 1984). Estes modelos de infecção experimental ajudaram a entender apenas parte dos mecanismos do hospedeiro envolvidos na resposta protetora, já que a infecção experimental difere do que é observado na leishmaniose tegumentar humana.

Algumas evidências têm sido acumuladas de que a resposta imune participa da lesão tecidual observada na leishmaniose tegumentar causada por *L.braziliensis*: 1) Os pacientes com LC e LM apresentam uma grande produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (RIBEIRO DE JESUS et al., 1998; BACELLAR et al., 2002) entretanto ao invés de controlar a infecção, desenvolvem ulcerações cutâneas e mucosas; 2) Células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LM e LC quando estimuladas com antígenos de *L. braziliensis in vitro* produzem baixa concentração de IL-10 e a adição exógena dessa citocina não modula a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nesses pacientes (BACELLAR et al., 2002 ); 3) Embora IL-10 seja expressa em células da lesão de pacientes com LM e LC, as células da lesão mucosa expressam menos receptor de IL-10 do que células da lesão cutânea (FARIA et al., 2005); 4) O uso da pentoxifilina (inibidor da produção de TNF- $\alpha$ ) associada ao antimônio (droga de primeira escolha no tratamento das leishmanioses), cura pacientes com leishmaniose mucosa que são refratários ao tratamento com antimonial (LESSA et al., 2001) e essa associação é mais efetiva e diminui o tempo de cura que o antimonial sozinho no tratamento da leishmaniose cutânea (MACHADO et al., 2007). Na ausência da ativação de células Th1 a produção de IFN- $\gamma$  é baixa ou ausente, os macrófagos perdem a capacidade de destruir *Leishmanias* e formas disseminadas da leishmaniose são observadas assim como a leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea difusa

(CARVALHO et al., 1985; BOMFIM et al., 1996). Do ponto de vista histopatológico, as lesões de pacientes com LC e LM são caracterizadas por um processo inflamatório com linfócitos e plasmócitos, ausência ou raros parasitos (BITTENCOURT; BARRAL, 1991; MENDES et al., 2013).

A resposta na leishmaniose disseminada ainda não está muito bem esclarecida. Alguns dos poucos estudos realizados no tema apontam que estes pacientes apresentam uma resposta imune celular ao antígeno de *Leishmania in vitro* com uma produção de IFN- $\gamma$  e de TNF- $\alpha$  significativamente menor que a produção observada em pacientes com LC (TURETZ et al., 2002; Machado et al., 2011). Em adição, a avaliação *in situ* de citocinas demonstrou não haver diferença estatisticamente relevante na produção de TGF- $\beta$ , CCL2, CCL3, CCL11 e CXCL10 entre os pacientes com LC e LD. Entretanto, a produção sistêmica de CXCL9, uma quimiocina relacionada com o recrutamento e ativação das células T, foi maior em pacientes com LD quando comparado com a produção observada em pacientes com LC. (MACHADO et al., 2011).

A análise de biópsias da lesão também mostrou que existe uma expressão diminuída de IFN- $\gamma$  em lesões de pacientes com LD quando comparado com pacientes com LC (VIEIRA et al., 2002). O infiltrado celular nos tecidos dos pacientes com LD parece ser formado principalmente por linfócitos B e macrófagos. Além dessas células também são encontrados linfócitos TCD8<sup>+</sup> e TCD4<sup>+</sup>, com os TCD8<sup>+</sup> em maior evidência, como também é observado na LC (VIEIRA et al., 2002; DANTAS et al., 2014). Com o processo inflamatório intenso ocorre também a formação de granulomas e mais rede vascular para suprir o aporte sanguíneo do tecido inflamado onde há um elevado consumo de nutrientes

e existe um grande fluxo de células que são recrutados para o local da lesão (MENDES et al., 2014).

#### IV. 5. O PAPEL DA RESPOSTA IMUNE INATA NO CONTROLE DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA*

Ao penetrar no hospedeiro a *Leishmania* interage com diferentes tipos celulares da resposta imune inata, incluindo neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Os macrófagos são as principais células que abrigam a *Leishmania* e conseqüentemente a sobrevivência ou a morte desse parasito depende da ativação dessas células. As promastigotas se ligam aos receptores dos macrófagos, entre eles, o CR3 (terceiro receptor do complemento), o CR1, (o primeiro receptor do complemento), o receptor de manose, o receptor gama Fc, e então são fagocitadas (revisado por Ueno & Wilson, 2012). Nesse momento a *Leishmania* promove a sua evasão dos mecanismos de destruição acionados pelo hospedeiro e prolifera no interior dos macrófagos até o seu rompimento e a liberação das formas amastigotas de *Leishmania* para o meio extracelular, que após a transformação em promastigotas, irão infectar novas células. Os macrófagos também produzem importantes moléculas que podem matar o parasito, como NO e espécies reativas do oxigênio (ROS), mas a sua ativação depende da produção de IFN- $\gamma$  que aumenta o estado microbicida dessas células (CHANG, 1981; LIEW ET AL., 1990). Apesar disso, a *Leishmania* também

consegue escapar destas investidas interrompendo microdomínios lipídicos nas membranas desses vacúolos fagocíticos (DERMINE et al., 2005).

Em contraste com o conhecimento do papel das células T na proteção e na resposta inflamatória associada à infecção por *L.braziliensis* que conseqüentemente leva ao dano tecidual, alguns estudos têm mostrado o papel dos monócitos/macrófagos na patogênese da LC. Estudos realizados em uma área endêmica de transmissão de *Leishmania Viannia panamensis*, mostraram que os macrófagos de pacientes com LC crônica (lesões com mais de 6 meses de duração) e com leishmaniose recorrente foram mais permissivos à entrada do parasito que os indivíduos com infecção sub-clínica (ROBLEDO et al., 1994; BOSQUE et al., 2000), sugerindo que esta proteção estava associada a uma maior capacidade dos macrófagos desses indivíduos em controlar a infecção. Um estudo mais recente mostrou que os macrófagos podem participar tanto da proteção do hospedeiro, quanto da doença na infecção por *L.braziliensis* (GIUDICE et al.,2012). Nesse estudo foi demonstrado que os macrófagos de indivíduos com infecção subclínica (SC) têm uma maior capacidade de matar a *Leishmania* quando comparado com macrófagos de pacientes com LC e LM.

O recrutamento da população celular no início da infecção parece ter papel importante no desenvolvimento da doença. Após a infecção por *Leishmania* os neutrófilos são as primeiras células a chegar ao sítio da infecção seguidas pelos monócitos/macrófagos. Durante esta fase, membros da família das quimiocinas tem uma importância fundamental na atração dos subtipos de leucócitos no sítio da infecção e de também estimulá-los (ROT, VON ANDRIAN, 2004). O papel das



quimiocinas na infecção por *Leishmania*, além do recrutamento dos leucócitos, inclui participação na imunidade mediada por células, ativação celular e atividade leishmanicida (TEIXEIRA et al., 2006). A produção de diferentes padrões de quimiocinas associadas às várias formas clínicas da leishmaniose tegumentar sugere uma importante participação dessas moléculas na resposta imune protetora a *Leishmania*. As lesões de pacientes com leishmaniose cutânea localizada auto curável apresentam alta expressão de CCL2, CXCL9 e CXCL10 (RITTER, KORNER, 2002).

Giudice et al. (2012), também demonstraram que a produção de CCL2 e CCL3 no sobrenadante de culturas de macrófagos infectados com *L. braziliensis* de pacientes com LC e LM foi maior que a produção por células de indivíduos SC. Adicionalmente, a produção de CXCL9, também foi maior por células de pacientes com LC e LM quando comparados com os SC. A produção de uma importante citocina pró-inflamatória, o TNF- $\alpha$ , também esteve mais elevada nas culturas de macrófagos de pacientes com LC e LM do que nos SC, o que sugere que a produção destas quimiocinas/citocinas durante a resposta imune inata contribui para o desenvolvimento da lesão.

Como a resposta imune adaptativa não esclarece os mecanismos de disseminação da doença, é importante também avaliar o papel da resposta imune inata através da avaliação do papel dos monócitos/macrófagos e de moléculas produzidas por essas células na patogênese da LD. Neste sentido, o estudo da participação de monócitos/macrófagos que são células importantes nos momentos iniciais da infecção pode contribuir para o entendimento de como estes componentes atuam e qual papel assumem na infecção por *Leishmania*.

#### IV. 6. MECANISMOS OXIDATIVOS ENVOLVIDOS NA MORTE DA *LEISHMANIA*

Ainda não foi possível esclarecer os mecanismos que permitem a persistência da *Leishmania* no organismo e em alguns casos leva à disseminação da doença, mesmo com uma forte resposta adaptativa contra antígenos do parasito. Sobre esse aspecto, tem sido discutida a idéia de que a resistência da *Leishmania* no hospedeiro poderia estar relacionada a uma incapacidade dos macrófagos desses pacientes em produzir espécies reativas necessárias para a eliminação do parasito (BUCHMULLER, MAUEL, 1981; MURRAY et al., 1983). Por outro lado, a *Leishmania* também se tornou alvo de estudo e diversos mecanismos de escape contra esses fatores microbicidas foram descritos no decorrer dos anos (ALEXANDER, VICKERMAN, 1975; CHANG, DWYER, 1976; LEWIS, PETERS, 1977; CHANG, DWYER, 1978; DERMINE et al., 2005).

Desde que as primeiras moléculas quimicamente reativas contendo oxigênio foram descobertas, o seu conhecimento e utilização se restringiam ao seu uso industrial, principalmente na indústria alimentícia. Esse panorama sofreu alterações quando Babior et al. (1973) demonstraram que leucócitos humanos produzem moléculas de superóxido ( $O_2^-$ ) quando desafiadas com determinados microrganismos. Com o passar dos anos novos estudos foram realizados para avaliar possíveis danos dessas moléculas a lipídios, assim como, o DNA (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1984; GUTTERIDGE et al., 1984).

A produção de espécies reativas ocorre naturalmente como um produto do metabolismo celular e tem funções importantes na sinalização celular e

homeostasia (SUNDARESAN et al., 1995; BAE et al., 1997; GIORGIO et al., 2005). Além disso, a produção dessas moléculas parece ser modulada pela ação de mecanismos enzimáticos, através da enzima glutathione peroxidase, que reduz a quantidade de espécies reativas disponíveis para reações oxidativas (YELIGAR et al., 2014; RUIZ-RAMÍREZ et al., 2014). O conceito de estresse oxidativo foi introduzido há quase três décadas e consiste em um desequilíbrio das espécies reativas geradas em relação à capacidade da enzima glutathione de removê-las e evitar possíveis danos às células (SIES, CADENAS, 1985; CADENAS, SIES, 1985; SIES, 1991; SIES, 1991). Esse estado de estresse oxidativo pode ser resultado de uma diversidade de estímulos ambientais, patológicos ou não, que provoquem o estresse celular. Contudo, um aumento na produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) é uma das primeiras respostas celulares seguidas do reconhecimento de patógenos (BABIOR et al., 1973; MANTEGAZZA et al., 2008)

O principal radical conhecido até esse momento era o superóxido, mas a descoberta do óxido nítrico (NO) em sistemas fisiológicos veio por volta dos anos de 1980-1990, apesar de ter sido descrito por Joseph Priestley em 1772. Inicialmente, foi atribuído ao NO uma função importante na patogênese de diversos processos patológicos, mas Robert F. Furchgott demonstrou através de uma série de trabalhos que esta molécula também possui importantes papéis biológicos (FURCHGOTT, ZAWADZKI, 1980; FURCHGOTT et al., 1984; MATSUNAGA, FURCHGOTT, 1989; FURCHGOTT, JOTHIANANDAN, 1991; MATSUNAGA, FURCHGOTT, 1991).

#### IV. 7. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Na presença de estímulos ambientais e patológicos os macrófagos rapidamente iniciam a produção de ROS através de um mecanismo dependente da enzima Nicotinamida-adenina-dinucleótidofosfato (NADPH) – oxidase dependente de fagócitos, utilizando para isso o oxigênio molecular (MIZRAHI et al., 2006). Essas reações culminam na formação do íon superóxido que, por conseguinte, pode sofrer dismutação e contribuir para a formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidroxilas ( $HO\cdot$ ), mas que também pode gerar outras espécies reativas de oxigênio através da ação da enzima mieloperoxidase, como o hipoclorito ( $HOCl$ ) (MURRAY, CARTELLI; 1983; CHANNON et al., 1984; ISCHIROPOULOS et al., 1992; ZINGARELLI et al., 1996; XIA, ZWEIER, 1997; VAN ASSCHE et al., 2011).

Os resultados da infecção por *Leishmania* parecem estar estritamente relacionados com os eventos iniciais que ocorrem durante a resposta imune inata. Nesse momento, os principais fenômenos que ocorrem na interação *Leishmania*-macrófagos são o reconhecimento, seguido pela internalização do parasito (RABINOVITCH, 1967; RUSSELL, TALAMAS-ROHANA, 1989; STUART, EZEKOWITZ, 2005). Como resultado dessas interações,  $O^{2-}$  passa a ser rapidamente produzido pelos macrófagos como consequência da interação *Leishmania*-macrófago (CHANNON et al., 1984). Assim como mencionado anteriormente, o  $O^{2-}$  atua como uma molécula precursora de outras ROS, tais como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radicais hidroxila ( $OH\cdot$ ), hipoclorito ( $HOCl$ )

(MURRAY, CARTELLI; 1983; CHANNON et al., 1984; ISCHIROPOULOS et al., 1992; ZINGARELLI et al., 1996; XIA, ZWEIER, 1997; VAN ASSCHE et al., 2011). Essas moléculas podem se combinar com NO para formar o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) que exibe um efeito tóxico contra *Leishmania* (LINARES et al., 2001; VAN ASSCHE et al., 2011). Em um estudo *in vitro* conduzido por Khouri et al. (2009), foi demonstrada uma associação entre a capacidade leishmanicida dos macrófagos e produção elevada de O<sub>2</sub><sup>-</sup> por estas células. Entretanto, outras evidências mostram que não existe diferença na produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> entre os indivíduos com infecção subcínica por *Leishmania* e aqueles que desenvolveram a forma cutânea ou mucosa da doença, o que sugere que outras moléculas possam estar envolvidas no processo microbicida (GIUDICE et al., 2012).

#### IV. 8. ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO

Ao contrário do que ocorre com os ROS, a formação do NO é dependente da ativação das células produtoras por meio das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF (EVANS et al., 1993; GANTT et al., 2001). A produção de NO é regulada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS), que possui três isoformas (neural – nNOS, indutível – iNOS e endotelial – eNOS). Todavia, iNOS está envolvida em funções relacionadas com o sistema imune e cardiovascular e as suas atividades estão ligadas à oxidação da L-arginina para L-citrulina, o que promove a formação de NO (VAN ASSCHE et al., 2011). Em um modelo de leishmaniose experimental

realizado por Blos et al. (2003), foi constatada a importância da iNOS, no qual foi relatado que na ausência da enzima existia um aumento significativo da carga parasitária. Nesse estudo, ainda na fase aguda da doença (nos dias 20 a 60), foi evidenciada a progressão das lesões ulcerosas dérmicas e um aumento da carga parasitária nos linfonodos. A exemplo dos modelos experimentais, estudos realizados com macrófagos humanos infectados por *L. chagasi*, utilizando L-NMMA, que é um inibidor de iNOS, foi observado um aumento da sobrevivência do parasito em macrófagos humanos (GANTT et al., 2001).

A despeito de NO ter um papel protetor em modelos murinos, existem controvérsias sobre o seu papel na morte da *Leishmania* em humanos (LIEW, 1990; EVANS et al., 1993; ASSREUY et al., 1994; MIAO, CLAIR, 2009). Guidice et al. (2012) também observaram que apesar de a produção de NO ter coincidido com a diminuição de parasitos intracelulares em macrófagos de indivíduos com infecção subclínica, não houve diferença significativa na produção desta molécula entre os pacientes com LC, LM e indivíduos SC, assim como também foi observado para com  $O_2^-$ . Por outro lado, sabe-se que a *Leishmania* desenvolveu alguns mecanismos de escape, incluindo o revestimento da sua membrana com glicolipídios chamados lipofosfoglicanos e a produção de moléculas anti-oxidantes como a superóxido dismutase (SOD) (GHOSH et al., 2003; SPATH et al., 2003). Os estudos envolvendo SODs apontam para um importante papel no estresse oxidativo de células eucarióticas (GETACHEW, GEDAMU, 2007). A ação da enzima SOD também já foi documentada em estudos em que a sua deficiência deixou a *L. donovani* mais susceptível à ação do  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  (GHOSH et al., 2003).

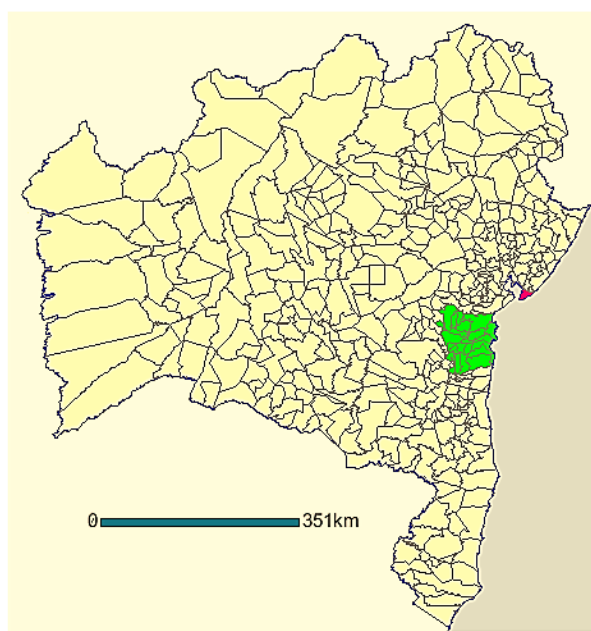
## **V. HIPÓTESE**

Monócitos/macrófagos de pacientes com leishmaniose disseminada (LD) são mais susceptíveis à infecção por *L.braziliensis* contribuindo para a disseminação da doença e produzem mais moléculas inflamatórias do que monócitos/macrófagos de pacientes com leishmaniose cutânea (LC).

## **VI. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS**

### **V. 1. ÁREA ENDÊMICA DE CORTE DE PEDRA**

O vilarejo de Corte de Pedra está localizado no município de Presidente Tancredo Neves, a 280 km de Salvador, capital da Bahia. Nesta região encontra-se um centro de referencia em leishmaniose, o Centro de Referência em Leishmaniose Dr. Jackson Costa, que vem atuando há mais de trinta anos prestando assistência aos indivíduos acometidos por leishmaniose em aproximadamente 10 municípios pertencentes a esta região. O referido centro conta com a colaboração de uma equipe multidisciplinar do Serviço de Imunologia (SIM) do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (COM-HUPES) da Universidade Federal da Bahia. A equipe realiza visitas periódicas ao centro nas quais são realizadas atividades de diagnóstico, tratamento e seguimento dos pacientes com leishmaniose. Além disso, os pacientes também são recrutados para participação de estudos diversos.



**Figura 1.** Localização da região de Corte de Pedra-BA. Fonte: Google imagens.



A região encontra-se geograficamente em uma área que fora dominada pela Mata Atlântica. Com o passar dos anos as áreas de mata primária deram lugar a pontos isolados de mata secundária com predomínio de áreas agrícolas desmatadas. É importante ressaltar a atividade do homem deformando a natureza como um importante fator para o seu envolvimento acidental em ciclos parasitários silvestres.

A principal fonte de renda para a população da região estudada é a agricultura de subsistência, com a cultura cacaueteira e lavouras como cravo, guaraná, banana, café, mandioca, pimenta-do-reino e seringueira. Estas atividades acabam por colocar o homem em exposições às espécies causadoras de leishmaniose que habitam naturalmente estes ecossistemas.

## V. 2. DESENHO DE ESTUDO

O presente estudo constitui-se de um corte transversal conduzido com pacientes de uma área endêmica para leishmaniose tegumentar americana. Nesta casuística foram incluídos 37 pacientes ao todo. Desse modo, 21 pacientes diagnosticados com leishmaniose disseminada e 16 pacientes diagnosticados com a forma cutânea clássica foram incluídos no estudo.

## V.3. DEFINIÇÃO DE CASOS

### **Leishmaniose Disseminada (LD)**

Pacientes que apresentam mais de 10 lesões com características variadas (papulares, acneiformes e ulceradas) em pelo menos duas regiões distintas do corpo. O diagnóstico foi realizado pela detecção do parasito através da cultura do

aspirado da lesão, pelo achado das lesões típicas associado ao teste positivo de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* (Reação de Montenegro) e histopatologia compatível com leishmaniose tegumentar. O diagnóstico também tem sido realizado através documentação de DNA para *L.braziliensis* por Reação da Polimerase em Cadeia quantitativa (qPCR) de biópsias das amostras de lesões.

### **Leishmaniose Cutânea (LC)**

É definida como a presença de lesão única ulcerada na pele, sem evidência de envolvimento da mucosa. O diagnóstico é realizado pela detecção do parasito através da cultura do aspirado da lesão, ou pelo achado da lesão típica associado ao teste positivo de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* (Reação de Montenegro) e histopatologia compatível com leishmaniose tegumentar. O diagnóstico também tem sido realizado através documentação de DNA para *L.braziliensis* por Reação da Polimerase em Cadeia quantitativa (qPCR) de biópsias das amostras de lesões.

#### V. 4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes com leishmaniose disseminada e leishmaniose cutânea foram selecionados com base nos critérios clínicos já relatados. Foram selecionados pacientes de qualquer gênero, com idade superior a 15 anos e inferior a 60, residentes na área endêmica de Corte de Pedra, com diagnóstico de LD e LC e com presença de lesões não superior a 60 dias e virgens de tratamento.

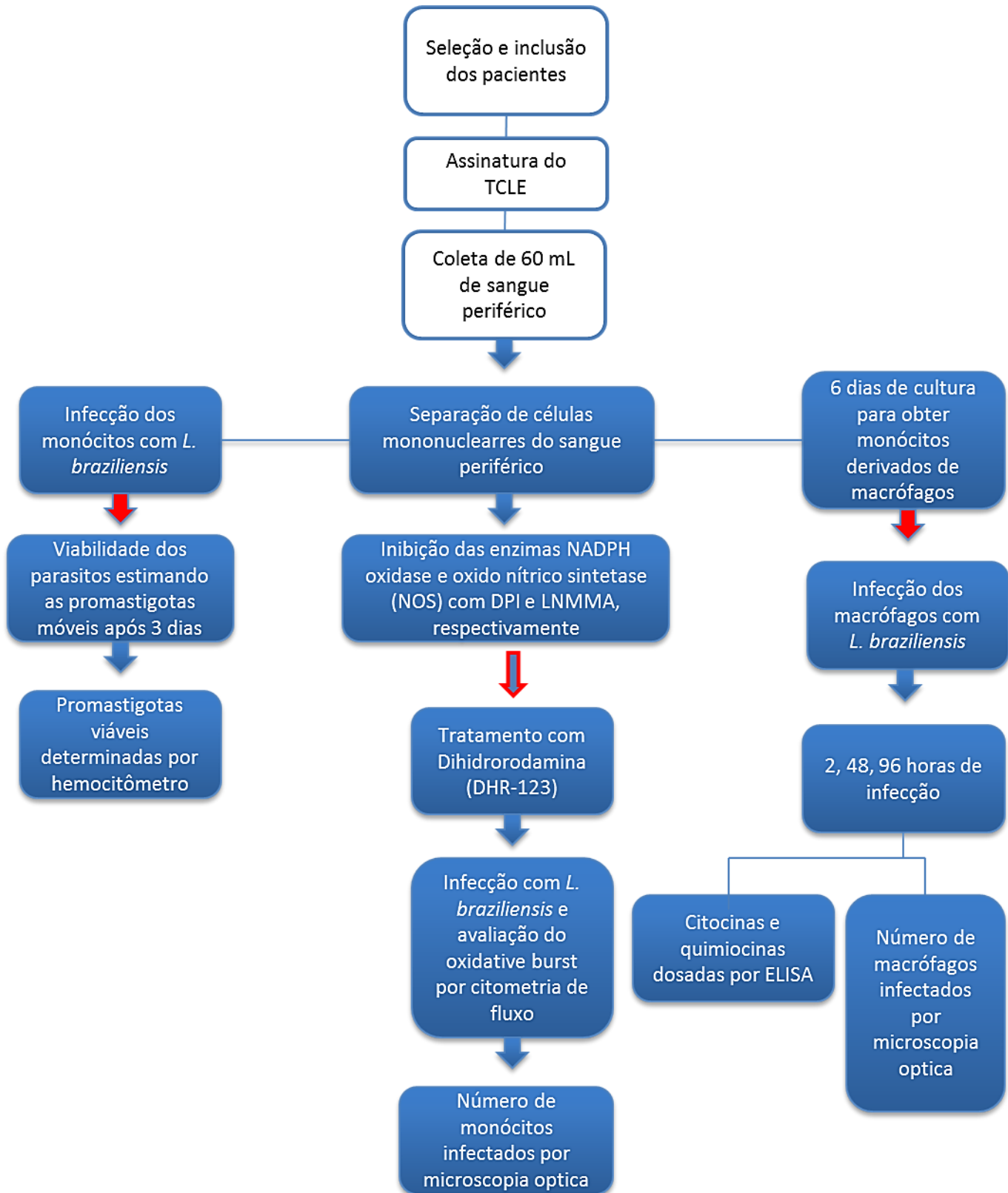
#### V. 5. CRITÉRIO DE NÃO-INCLUSÃO

Pacientes que façam uso de drogas imunossupressoras ou que apresentem alguma condição que possa causar alteração na resposta imune. Pacientes com sorologia positiva para HIV e portadores de doenças debilitantes como insuficiência renal, insuficiência hepática e diabetes mellitus não fizeram parte deste estudo, assim como pacientes com idade inferior a 15 anos e gestantes.

#### V. 6. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, parecer nº 25/2012. Todos os pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). (Anexo I)

## V. 7. METODOLOGIA



### **V.7.1. Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)**

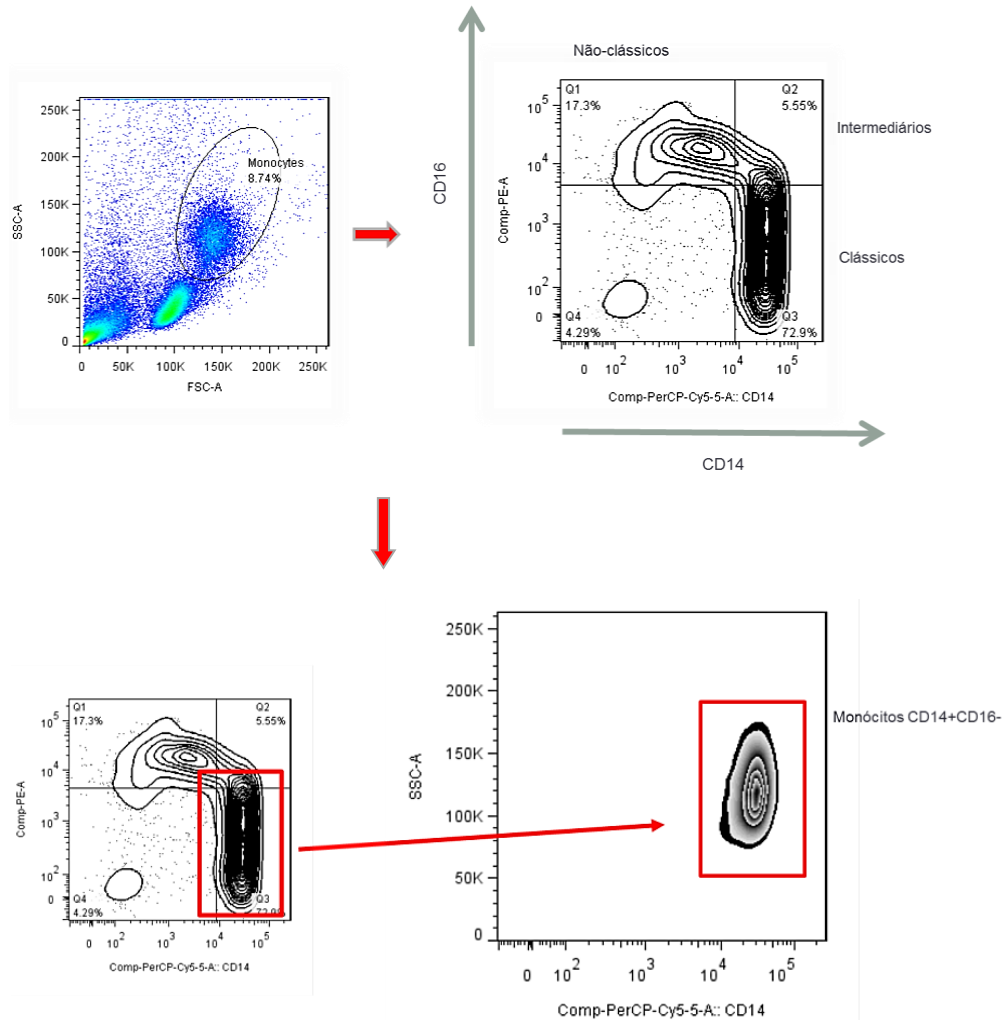
Foram coletados 60 mL de sangue total heparinizado de pacientes com LD e LC. As amostras de sangue foram diluídas em uma proporção de 1:2 com solução NaCl a 0,9% (25°C). O isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foi realizado utilizando o Ficoll-Paque Plus™ (GE Health Care, Bio-Sciences AB, NC, USA) e a técnica obedece ao princípio da separação por gradiente de densidade.

O sangue heparinizado e diluído em solução salina foi colocado em uma camada sobre o reagente Ficoll e centrifugado por 30 minutos a 1450 rpm. Durante o processo de centrifugação ocorre a migração de diferentes tipos celulares através do Ficoll e a formação, e o estabelecimento, de camadas isoladas com base na densidade de cada tipo celular. O Ficoll possui em sua fórmula compostos que promovem o agregamento eritrocitário, com a centrifugação os eritrócitos se precipitam e ficam na camada inferior do tubo. A pressão osmótica do Ficoll também faz com que os granulócitos assumam uma densidade ainda maior e, por esse motivo, migram através do Ficoll para a camada que já contém os eritrócitos. Entre o precipitado eritrocitário e o plasma encontram-se as células mononucleares, em sua maior parte linfócitos, mas também monócitos. Dessa forma, a camada de células mononucleares foi cuidadosamente retirada e foram ressuspensas em solução salina 0,9% e centrifugadas por duas vezes a 1290 rpm por 10 minutos para remover plaquetas, Ficoll, ou plasma.

Por ultimo, as PBMCs foram colocadas em meio de cultura RPMI 1640 (RPMI 1640, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (Gibco Laboratories, Invitrogen, América do sul) além também do agente antimicrobiano gentamicina (10UI/mL).

## V. 7.2. Análise da expressão de CD14 e CD16

Os experimentos com a análise dos monócitos por Citometria de fluxo foram realizados com os monócitos clássicos (CD14<sup>high</sup> CD16<sup>-</sup>). Após a separação das PBMCs os monócitos foram marcados com os anticorpos anti-human CD14 (PerCP/Cy5.5, BioLegend, CA, USA) e anti-human CD16 (PE, BioLegend, CA, USA) diluídos em uma proporção de 1:10. Após a marcação foram adquiridos 100.000 eventos no aparelho de citometria de fluxo e de acordo com os parâmetros já conhecidos de tamanho (SSC) e granulosidade (FSC) apresentados pelos monócitos delimitou-se a região em que os monócitos estavam localizados. A partir desta análise é possível selecionar uma população celular com base na expressão dos grupamentos de diferenciação empregados, e também selecionar um *gate* com a população de interesse a ser utilizada nas análises subseqüentes (**Figura 2**).



**Figura 2. Representação da caracterização fenotípica de monócitos clássicos CD14 após separação das PBMCs e marcação com anticorpos anti-CD14 (PerCP/Cy5.5) e anti-CD16 (PE).**

### V. 7.3. Cultivo da *Leishmania* e preparo para infecção

Foram utilizados parasitos de *L. braziliensis* (MHOM/BR/LTCP11245) caracterizados quanto à espécie pelo método de eletroforese de enzima multicolus (CUPOLILLO et al., 1994). Este isolado foi obtido a partir de uma lesão cutânea de um paciente com LC clássica da área endêmica de Corte de Pedra. Após o isolamento os parasitos foram cultivados em meio bifásico NNN. Para garantir a manutenção do isolado os parasitos foram criopreservados em nitrogênio líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  no Serviço de Imunologia do HUPES.

O isolado do parasito foi retirado do criopreservamento e mantido em meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e os antimicrobianos penicilina G e sulfato de estreptomicina (Pen-Strep) (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) à uma temperatura monitorada de  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dessa forma, acompanhou-se o crescimento das formas promastigotas do parasito durante 7 dias com contagens diárias afim de caracterizar as suas fases Lag, estacionária e Log. Vale ressaltar que a fase estacionária é a fase ideal para ser utilizada no momento da infecção, que foi alcançada após 3 dias de cultura no meio Schneider.

No momento da infecção os parasitos foram contabilizados utilizando uma camara de Neubauer e ajustou-se a sua concentração para que cada  $1 \times 10^6$  células fossem desafiadas com  $5 \times 10^6$  *L. braziliensis*, uma proporção de 5 parasitos para cada célula (5:1).

Para a avaliação da produção de intermediários reativos em monócitos realizou-se uma infecção por 20 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com 5% de  $\text{CO}_2$ , tempo em que já se observa a presença dos intermediários. Além de serem infectadas com *L. braziliensis*, empregou-se também um controle positivo com Phorbol-miristatoacetado (PMA) ( $10\text{ ng/mL}$ ) + Ionomicina para estimular o estresse celular e a produção de radicais. Todavia, para a avaliação do percentual de monócitos e macrófagos infectados e de carga parasitaria foram utilizados os tempos de 2, 24, 48 e 72 horas de infecção, além do tempo de 96 horas apenas para os



macrófagos.

#### **V. 7.4. Inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio por monócitos**

A inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi realizada por meio de um inibidor da enzima NADPH oxidase, o Diphenyleneiodonium chloride (DPI) (Sigma-Aldrich, MO, USA), em uma concentração de 10  $\mu$ M. Por sua vez, a inibição das espécies reativas do nitrogênio (NO) se deu pelo emprego do inibidor da enzima óxido nítrico sintetase (NOS), L-N<sup>G</sup>-monomethyl arginine acetate (L-NMMA) (Cayman Chemical, Michigan, USA), a uma concentração de 1 mM. Após adição as células foram incubadas por 10 minutos (37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub>) antes de serem infectadas ou estimuladas.

#### **V. 7.5. Avaliação da suscetibilidade dos monócitos à infecção com *L. braziliensis***

Os monócitos infectados com *L. braziliensis* foram incubados a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub>, durante os períodos de 2, 24, 48 e 72 horas em tubos separados. Com o intuito de avaliar os efeitos da inibição das vias da explosão respiratória lançou-se mão dos seus inibidores DPI e L-NMMA. Assim, os tubos foram marcados com as seguintes tarjas, em todos os tempos de infecção: Infecção; infecção+DPI e infecção+L-NMMA.

Após o término de cada período as culturas eram lavadas com solução NaCl 0,9% e o percentual de células infectadas e de carga parasitária eram estimados após a confecção de lâminas de microscopia por meio da técnica de

Cytospin, coradas pelo Giemsa (método panótico - Método de May-Grunwald-Giemsa). A carga parasitária foi determinada pelo número absoluto de parasitos nas 100 células contabilizadas.

#### **V. 7.6. Avaliação da viabilidade da *L. braziliensis* em culturas de monócitos infectados com o parasito**

Após 2 horas de infecção com o parasito, as culturas foram lavadas por duas vezes para a retirada das formas promastigotas que não conseguiram adentrar nos monócitos. As *Leishmanias* que conseguiram esse feito permaneceram no interior dos monócitos utilizando da maquinaria da célula hospedeira para a sua proliferação e garantia da sobrevivência. O meio de cultura RPMI 1640 foi substituído pelo meio Schneider que favorece o crescimento do parasito. Dessa forma, pretendeu-se monitorar a sobrevivência da *L. braziliensis* após a retirada das formas promastigotas do espaço extracelular e a manutenção das células infectadas nas culturas. Após os períodos de 2, 24, 48 e 72 horas estimou-se o número de promastigotas viáveis através da contagem dos parasitos móveis nos sobrenadantes das culturas. DPI e L-NMMA também foram utilizados para avaliar os efeitos da inibição da produção de espécies reativas de ROS e NO na viabilidade do parasito.

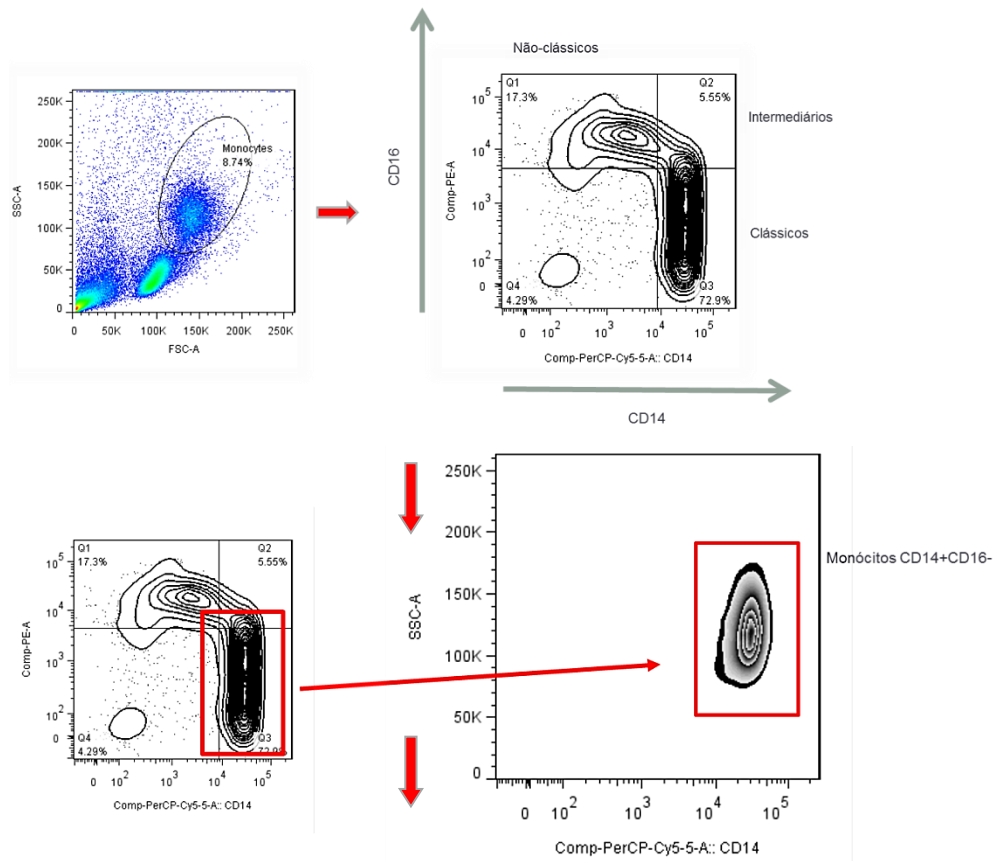
#### **V. 7.7. Análise da expressão do burst oxidativo em monócitos por citometria de fluxo**

A avaliação da expressão do burst oxidativo foi realizada por meio da sonda Dihydrorhodamine 123 (DHR-123) (Cayman Chemical Company, Michigan, USA)

que é um indicador não fluorescente que pode difundir membranas celulares de forma passiva. Contudo, a DHR-123 ao interagir com as espécies reativas converte-se em rhodamine-123 e emite fluorescência na cor verde, identificável por citometria de fluxo.

Os monócitos foram sensibilizados com 10ng/mL de DHR-123 por 10 minutos a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, estas células foram infectadas com *L. braziliensis* na proporção de 5 parasitos para cada monócito ou estimuladas com Phorbol-miristato-acetado (PMA) (10ng/mL) + Ionomicina, como controle positivo da estimulação da produção de radicais.

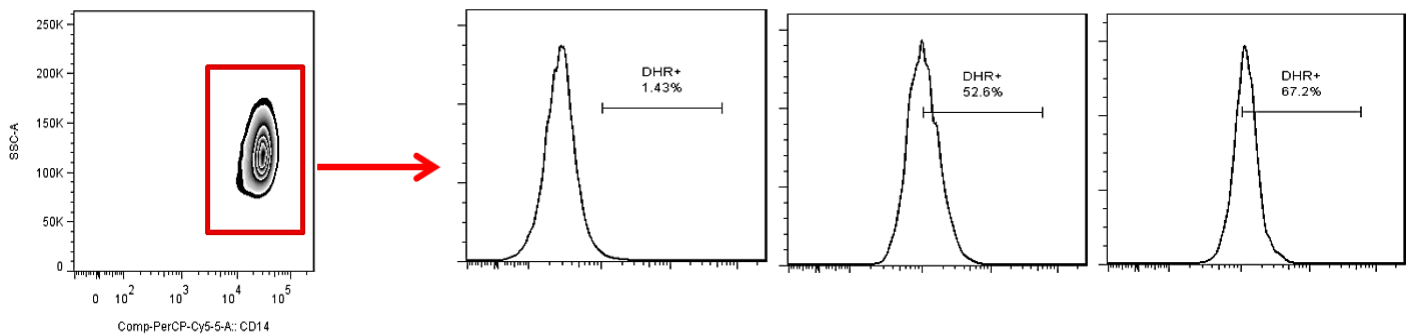
A utilização dos anticorpos anti-CD14 e anti-CD16 permitiram a identificação clara da população de monócitos clássicos CD14+CD16-expressando DHR-123. A estratégia gráfica mostrada na **Figura 3** ilustra como as análises foram feitas.



MEIO

LBB

PMA+IONO.



**Figura 3. Representação gráfica da análise da expressão do burst oxidativo em monócitos do sangue periférico.** Os monócitos clássicos foram identificados a partir da marcação com anticorpos anti-CD14 e anti-CD16 e a expressão do burst oxidativo avaliada através da DHR-123. Em seguida, estas células foram infectadas com *L. braziliensis* (LBB) na proporção de 5 parasitos para cada monócito ou estimuladas com Phorbol-miristato-acetado (PMA) (10ng/mL) + Ionomicina, como controle positivo da estimulação da produção de radicais.

### **V. 7.8. Avaliação da susceptibilidade dos macrófagos à infecção com *L. braziliensis***

Após a separação das PBMCs as células foram postas em placas de cultura Lab-Tek Chamber Slide (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Com o passar das primeiras 24 horas de cultura os poços de cultura foram lavados com solução NaCl 0,9% (25°C) para a retirada das células não aderentes, permanecendo apenas as células que iriam se diferenciar em macrófagos. Os monócitos foram mantidos em cultura por 6 dias, tempo necessário para a diferenciação dos monócitos em macrófagos, em meio de cultura RPMI.

Os macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico foram infectados com *L. braziliensis* em uma proporção de 5 parasitos para cada macrófago e incubados pelos períodos de 2, 48 e 96 horas a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Os sobrenadantes destas culturas foram coletados e armazenados a -20 °C para a posterior dosagem de citocinas por imunoenensaio (ELISA). As placas lab-tek foram coradas com Giemsa e foram analisados o percentual de células infectadas e a carga parasitária nestas células.

### **V. 7.9. Análise estatística**

Os dados obtidos nesse estudo foram analisados estatisticamente pelo software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

O número amostral foi calculado com base em dados do estudo realizado por Giudice et al (2012), onde foi observado que os macrófagos de pacientes com LC e LM apresentavam maiores percentuais de infecção e de carga parasitária do que os macrófagos de indivíduos subclínicos e os controles sadios. Com base nesses dados seriam necessários 13 pacientes de cada grupo (LD e LC), com poder de 80% e com um alfa de 0,05.

Foi realizada uma análise de distribuição de frequências de D'Agostino Pearson para todos os resultados obtidos para verificar se os dados seguiam ou não a curva normal. Dessa forma, determinou-se o uso das medidas centrais: médias com os seus desvios-padrão ou medianas com a amplitude interquartil. Também foi possível definir os testes estatísticos a serem utilizados sabendo se os dados eram paramétricos ou não-paramétricos.

Para os dados não-paramétricos a comparação entre dois grupos se deu pelo teste U de Mann-Whitney. Todavia, quando as amostras eram pareadas foi necessário utilizar o teste T para amostras pareadas de Wilcoxon. Quando o objetivo era comparar dois ou mais grupos foi adotado o teste de Kruskal-Wallis. O erro  $\alpha$  abaixo de 5% ( $p < 0,05$ ) foi considerado para significância estatística.

Quando foi necessário verificar a existência de associação entre variáveis de interesse, utilizou-se a correlação de Spearman. A escolha do tipo de correlação empregada foi feita assumindo o pressuposto de que as populações seguiam uma distribuição Gaussiana, ou não, e também com base no tamanho amostral. Para atestar a existência de casualidade entre os fenômenos observados (causa-efeito), aplicou-se o modelo de regressão linear simples, onde Y era a variável dependente.

## **ARTIGO**

“Disseminated leishmaniasis patients are more susceptible to *Leishmania braziliensis* infection and produce more inflammatory molecules than cutaneous leishmaniasis patients.” (Artigo a ser submetido na Revista BMC Infectious Diseases, *vide* Normas de Publicação no **ANEXO III**).

**Title: Disseminated leishmaniasis patients are more susceptible to *Leishmania braziliensis* infection and produce more inflammatory molecules than cutaneous leishmaniasis patients**

Michael Macedo (macedo.m@outlook.com)<sup>1</sup>; Pedro Paulo Carneiro (pedropcarneiro@ig.com.br)<sup>1</sup>; Ângela Giudice (angela\_giudice@yahoo.com.br)<sup>1</sup>; Paulo Machado (prlmachado@hotmail.com)<sup>1,2</sup>; Edgar M. Carvalho (edgar@ufba.br)<sup>1,2</sup>; Olívia Bacellar (olivinhaufba@gmail.com)<sup>1,2</sup>.

1. *Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade*

*Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil*

2. *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais - INCT-DT*

*(CNPq/MCT), Salvador, BA, Brazil*

Corresponding author:

Olívia Bacellar

Serviço de Imunologia

Hospital Universitário Prof. Edgard Santos

Universidade Federal da Bahia

Salvador, BA, Brazil

Tel.: 00 55 71 3237-7353

FAX: 00 55 71 3245-7110

Email: [olivinhaufba@gmail.com](mailto:olivinhaufba@gmail.com)



## Abstract

**Background:** Disseminated leishmaniasis (DL) is an emerging form of *Leishmania braziliensis* infection characterized by multiple cutaneous lesions on different body parts. The mechanism that allows parasite dissemination in DL is unknown. Monocytes/macrophages play an important role in the innate immune response and the early control of *Leishmania* parasites has been associated with macrophages activation and parasite killing. However, some studies have shown that macrophages also may participate in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis (CL). **The aim of this study** was to characterize the function of monocytes/macrophages from DL patients upon infection with *L.braziliensis*. **Methods:** Peripheral blood monocytes and monocyte-derived macrophages of DL and CL patients were infected with *L. braziliensis* in a ratio of 5:1 in different periods of time. The number of infected monocytes and parasite load was determined by optical microscopy. Promastigotes viability was assessed by counting of extracellular motile promastigotes after 3 days of culture in Schneider medium. Determination of oxidative burst was performed by oxidation of Dihydrorhodamine 123 and assessed by flow cytometry. Cytokine/chemokines production was measured by enzymatic immunoassay (ELISA). **Results:** Monocytes from DL patients had a lower proportion of infected cells and parasite burden as compared to CL patients at the last time of infection. However, the number of viable parasites at 72 hours, in supernatants of culture of monocytes was higher in DL patients. The production of oxidative burst by monocytes from DL patients after infection with *L. braziliensis* was lower as compared to CL monocytes. The production TNF, CXCL9 and CXCL10 cytokines were higher in cultures of macrophages from DL patients as compared to CL patients. A strong correlation was observed between TNF production by macrophages and the number of lesions in patients with DL. **Conclusion:** The proliferation of *L. braziliensis* in patients with disseminated cutaneous leishmaniasis is likely associated with low production of oxidative burst and the higher production of inflammatory molecules by macrophages may contribute to pathogenesis of the disease.

**KEYWORDS:** Disseminated leishmaniasis, *Leishmania braziliensis*, macrophages, monocytes, chemokines.

## Introduction

Leishmaniasis is a group of diseases caused by protozoans of *Leishmania* genre. Infection with *Leishmania spp.* species may cause different clinical forms ranging from self-resolving cutaneous leishmaniasis (CL) to disseminated leishmaniasis (DL). Among these clinical manifestations, CL is the most common and is tough to be a benign form characterized by one ulcerated cutaneous lesion. It has been estimated which 3 percent of this individuals with CL can develop mucosal leishmaniasis (ML), a severe disease form (1). However, 10 percent of those who lives in endemic areas have positive intradermal reaction (DTH) and are known as subclinical individuals (SC), but do not develop the disease (2, 3). Disseminated leishmaniasis (DL) is an emerging form of leishmaniasis distinguished by its unique clinical and immunological features. Early studies have shown their clinical similarity with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) but several studies involving the immunological aspects of DL helped to differentiate both forms (4, 5). DL caused by *L. braziliensis* and *L. amazonensis* (4) is mainly observed in brazilian northeast, in the endemic area of Corte de Pedra, Bahia, where all country's disseminated leishmaniasis cases are reported (4, 5). DL patients may present up to 800 cutaneous lesions (popular, acneiform and ulcerated) located in two or more body parts (head, trunk, arms, and legs) with elevated mucosal involvement (4-6). Although there is no evidence about disease dissemination, some authors suggest a hematogenous dissemination (4).

Experimental models of leishmaniasis have suggested that an adaptive Th1 immune response is important to resistance and a Th2 immune response is crucial to disease development (7, 8). Nevertheless, in human tegumentary leishmaniasis the adaptive Th1 immune response is strongly associated with disease pathology. While cutaneous and

mucosal leishmaniasis are characterized by strong type 1 immune response with high levels of IFN- $\gamma$  and TNF and low levels of IL-10 (9), immune response in DL is still unclear. Early studies have shown that these patients present a lower antigen-specific production of IFN- $\gamma$  and TNF as compared to CL patients (5, 6). The *in situ* immune response shown that there is no difference in the production of TGF- $\beta$ , CCL2, CCL3, CCL11 and CXCL10 between CL and DL patients. However, the systemic production of CXCL9, a T cell related chemoattractor chemokine, was higher in DL patients as compared to CL (6). Lesions of DL patients also present low expression of IFN- $\gamma$  as compared to CL patients (10) and B-lymphocytes as well as macrophages are the main cells in DL lesions (10, 11).

Macrophages play a central role in *Leishmania* infection hosting the parasites and produce inflammatory molecules that may contribute to protection or pathology (12). The mechanisms that allow the persistence of *Leishmania* in the body and in some cases leads to disease dissemination are not clear yet, even with a strong adaptive response against parasite antigens. On that point, it has been discussed the idea that the resistance of *Leishmania* in the host could be related to an inability of macrophages from these individuals to produce reactive species necessary for parasite elimination (13, 14). In the other hand, *Leishmania* also became subject of study and many escape mechanisms have been described over the years (15-19). The production of reactive species occurs constitutively as a product of cellular metabolism and has important functions in cell signaling and homeostasis (20-22). Furthermore, production of these molecules seems to be modulated by the action of enzymatic mechanisms by glutathione peroxidase, which reduces the amount of reactive species available for oxidative reactions (23, 24).

In the presence of environmental and pathological stimuli, macrophages rapidly initiate the production of reactive oxygen species (ROS) through a nicotinamide adenine

dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH-oxidase) mechanism (25). After *Leishmania*-macrophage interaction superoxide ( $O^{2-}$ ) is rapidly produced in attempt to eliminate the parasite (26). The  $O^{2-}$  either works as a precursor molecule of all the others ROS including hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hydroxyl radicals (OH), hypochlorite ( $HOCl^{\cdot}$ ) (14, 26-30). These molecules can combine with NO and form peroxynitrite ( $ONOO^{\cdot}$ ) with a strong effect against *Leishmania* parasites (30, 31). Elevated production of  $O^{2-}$  is associated with increased ability of macrophages to kill *Leishmania* parasites (12, 32). Different of what happens to ROS, the NO production depends to cell activation by IFN- $\gamma$  and TNF cytokines (33, 34). NO production is regulated by nitric oxide synthase (NOS) presenting three different isoforms (neural – nNOS, inducible – iNOS and endothelial – eNOS). In murine models, iNOS lack is associated with increased parasite load (35). The same study revealed that these mice presented progression of ulcerative dermal lesions and increased parasites in the lymph nodes (35). However, studies with human macrophages infected with *Leishmania* showed that L-NMMA, an iNOS inhibitor, contributed to *Leishmania* survival within macrophages (34).

Despite the protective role of NO in murine models, there are controversies about the role of this molecule in *Leishmania* killing by humans macrophages (33, 36-38). Infection of macrophages from subclinical individuals results in NO production with reduction of *Leishmania* intracellular parasites. However, there was no significant difference in NO production when this group were compared with patients, as well as  $O^{2-}$  (12). Moreover, *Leishmania* also develop the ability to escape from these destructive molecules, including the production of lipophosphoglycan and superoxide dismutase (SOD) (39, 40). Most of studies concerning the immune response in leishmaniasis have focus on adaptive immune response and they do not explain until now the mechanisms that

could contribute to dissemination of disease. These evidences bring the need to better understand the features of the innate immune system assessing the role of monocytes/macrophages and molecules produced by these cells in disseminated leishmaniasis pathogenesis. The aim of this study was to characterize the function of monocytes/macrophages from DL patients upon infection with *L.braziliensis*. We evaluate and compare the susceptibility of monocytes and macrophages from DL and CL as well as compare the oxidative burst expression and the production of inflammatory molecules produced by these cells upon *L. braziliensis* infection. In the present study, we found that there is no association between ability of macrophages to kill *Leishmania* and cytokine production. While the pathogenesis of tegumentary leishmaniasis has been associated with adaptive immune response, our data emphasizes that macrophages may play a pivotal role in disease outcome in *L. braziliensis* infection.

## **Methods**

### **Subjects**

The studied population was composed by 21 DL patients and 16 CL patients. They reside in a region located at Presidente Tancredo Neves district, southeast region of the Bahia state, and look for care at Corte de Pedra Health Post, a well-known reference center for leishmaniasis of this region. Corte de Pedra is known for its high rate of *L. braziliensis* transmission. The diagnostic criteria for DL were to present least 10 lesions in two or more body parts and CL patients present an ulcerated lesion, without mucosal involvement. The Confirmation was followed by parasite identification after isolated from lesions, positive

delayed-type hypersensitivity (DTH) response to *Leishmania* antigen, and histological features of DL. The diagnostic have been also performed through *L. braziliensis* DNA documentation by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) of biopsied lesions.

## **Parasites**

The *L. braziliensis* parasites (MHOM/BR/LTCP11245) were obtained from a cutaneous lesion of a classical lesion of cutaneous leishmaniasis from Corte de Pedra. They were expended in biphasic NNN medium and then cryopreserved in liquid nitrogen at -196 °C. Before use, we estimate at what time parasites reach the stationary phase with a daily counting throughout 7 days. Before use, the parasites were expanded in complete Schneider's medium. The isolated was identified as *L. braziliensis* by multicolus enzyme electrophoresis (41).

## **Inhibition of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species production by monocytes**

An NADPH oxidase inhibitor, Diphenyleneiodonium chloride (DPI) (Sigma-Aldrich, MO, USA), at a concentration of 10 µM, performed ROS inhibition. In order to inhibit NO production, L-N<sup>G</sup>-monomethyl arginine acetate (L-NMMA) (Cayman Chemical, Michigan, USA) at a concentration of 1mM was used to impair the nitric oxide synthase (NOS) activity. After addition, the cells were incubated for 10 minutes (37° C, with 5% of CO<sub>2</sub>) before infection or stimulus.

## **Evaluation of monocytes susceptibility to *L. braziliensis* infection**

After peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolation, the monocytes were infected with *L. braziliensis* and incubated at 37° C, with 5% of CO<sub>2</sub>, during the periods of 2, 24, 48 and 72 hours in separated tubes. With the intention of assay inhibition effects of both ways, ROS and NO, we supplemented the cultures with DPI and L-NMMA. After each period of culture the tubes were washed with saline solution (NaCl 0.9%) and the percentage of infected cells and parasite burden were estimated after production of microscopy slides through the Cytospin method, which were also stained by Giemsa (May-Grunwald-Giemsa Method). Parasite burden was estimated by the number of intracellular parasites in 100 counted cells.

## ***Leishmania braziliensis* viability assessment in cultures of infected monocytes**

After 2 hours of infection with the parasite, the cultures were washed with the goal to take off the extracellular parasites. Culture medium RPMI 1640 was replaced with Schneider's medium to favor *Leishmania* grow. Thus, we claim noticing *Leishmania* viability after removing extracellular parasites and keeping the infected cells. After the periods of 2, 24, 48 and 72 hours, we estimate the number of viable parasites by the counting of motile parasite in the supernatants. DPI and L-NMMA were either used to assay the parasites viability after inhibition of ROS and NO.

## **Evaluation of oxidative burst expression in peripheral blood monocytes**

The oxidative burst evaluation was performed through use of the probe Dihydrorhodamine 123 (DHR-123) (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) a nonfluorescent indicator which have the ability of diffuse cellular membranes passively. The monocytes were stained with the concentration of 10 ng/mL of DHR-123 for 10 minutes at 37° C, with 5% of CO<sub>2</sub>. Then, the cells were infected with *L. braziliensis* at a proportion of five parasites to each monocyte (5:1) or stimulated with Phorbol-myristate-acetate (PMA) (10 ng/mL) + ionomycin, as a positive control of reactive species production. The use of anti-CD14 and anti-CD16 antibodies allow the clear identification of classical monocytes CD14+CD16- expressing DHR-123. Graphical strategy presented at **Figure 1** illustrate how the analyses were done.

## **Macrophages infection by *L. braziliensis* and cytokine production**

After PBMC isolation, the cells were plated at Lab-Tek Chamber Slide plates (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Over 24 hours of culture the wells were washed with NaCl 0.9% (25%) to take off the nonadherent cells remaining the cells that will differentiate into macrophages. Monocytes were kept in culture for 6 days, time required for monocytes differentiation into macrophages, in RPMI medium. Monocyte-derived macrophages were infected with *L. braziliensis* at a proportion of five parasites to each macrophage (5:1) and incubated for 2, 48 and 96 hours at 37° C, with 5% of CO<sub>2</sub>. These culture's supernatants were collected and stored at -20° C for cytokines assessment by ELISA. The plates were stained with Giemsa and the percentage of infected cells and



parasite burden were assessed.

## **Statistical analysis**

Obtained data were statistically analyzed by GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). With the nonparametric data, the comparison between two groups was done by the Mann-Whitney test. However, paired samples were compared by the paired test of Wilcoxon. To compare two or more groups were used the test of Kruskal-Wallis. Furthermore, when was necessary to verify the association between variables of interest we used Spearman correlation, depending on the type of distribution (Gaussian or not) and sample size. In order to evaluate the causality existence between the observed phenomes (cause-effect), a simple linear regression model were applied.

## **Results**

### **Epidemiological, clinical and immunological features of studied population**

As can be observed in the **Table 1**, patients of male gender was predominant in the population of disseminated leishmaniasis patients.

Regarding the intradermal reaction (DTH), we observed differences on the size of the reaction formed among the patients with disseminated and cutaneous leishmaniasis (12.7 x 11.3 mm *versus* 17.14 x 16 mm,  $p < 0.05$ ). While all patients with CL reacted to DTH test, we observed that 30% of DL patients had negative results to the DTH reaction. The mucosal involvement was also higher among DL patients as previously observed (5, 6).

The production of IFN- $\gamma$  and TNF by PBMCs from DL was lower as compared to the observed production by CL, settling prior observations regarding these cytokines production (5, 6). This reduced cytokine production do not explain the point of DL patients allow the parasite dissemination since an exacerbated immune response is observed in tissue level, with presence of several lesions, which do not control the infection.

A shared difficult observed in relation to DL management is the need of continue the treatment with one or more antimonial cycles (5). Our data shown which the patients with DL present a high therapeutic failure about two times of observed in CL patients (26.6 *versus* 12.5%).

### **Evaluation of the percentage of infection and the parasite burden in monocytes from disseminated leishmaniasis patients after *L. braziliensis* infection**

With the purpose of assay monocytes susceptibility of patients with DL upon *L. braziliensis* infection, the monocytes were infected with the parasite in a ratio of 5:1 during the periods of 2, 24, 48 and 72 hours. The number of infected cells and the burden was estimated by optical microscopy after the Cytospin process.

The infection kinetics performed shown that monocytes from DL patients kept their percentage of infection and the parasite burden unaltered after 24 hours of culture (**Figure 2**). However, with 48 hours we observed a reduction on the indicators of infection, although no statistically significant difference was not registered. Unexpectedly, we also shown which monocytes of DL patients were less infected (60% [44-65] *versus* 27% [15-32],  $p < 0.05$ ) and with a lower parasite burden (150 [84-213] *versus* 71 [36-85],  $p < 0.01$ ) after 72 hours of infection in relation to the period of 2 hours of infection.

As soon as were compared the percentages of infection and the parasite burden between monocytes from DL and CL patients, we found that DL monocytes were less infected (27% [15-32]) and with reduced parasite burden (71 [36-85]), after 72 hours of infection as compared to CL (37% [28-51]) ( $p < 0.02$ ); (100 [80-201]) ( $p < 0.05$ ) (**Figure 3**).

### **Evaluation of *L. braziliensis* viability in cultures of infected monocytes**

The observation which monocytes from DL patients were less infected and had a lower parasite burden as compared to CL patients, was an unexpected observation, since these data suggest which the cells of DL patients could control the infection.

To confirm these data we decided to investigate whether the decreased number of infected cells and the parasite burden was associated with the control of parasites by monocytes. For this, we performed a viability assay.

We observed a parasite proliferation in the supernatants of *L. braziliensis* infected monocytes from DL patients, which probably happened due to a cellular lysis and the promastigotas went to the extracellular compartment where they may proliferate. Nevertheless, no difference was found between the periods of culture performed (**Figure 4**). Even so, this observation has a great biological effect cause its high number of viable parasites in the extracellular compartment after 72 hours of infection ( $225 \times 10^4$  versus  $350 \times 10^4$ ).

Then we decided to compare the viable parasites in cultures of *L. braziliensis* infected monocytes from DL and CL patients. When comparing the number of viable promastigotas in the supernatants of infected monocytes we found that there was more *L.*

*braziliensis* parasites in the cultures of DL patients after 72 hours (35 [29-49]) as compared to CL (22 [12-30]) although not statistically significant ( $p=0.05$ ) (**Figure 5**). This data supports the idea that monocytes from DL patients could allow a parasite proliferation, as well as its dissemination. These data also suggest that the lower percentage of infection could occur due parasite proliferation within monocytes and after 72 hours, they had led to a cellular lysis going to the extracellular compartment.

### **Evaluation of oxidative burst expression by monocytes from disseminated leishmaniasis patients**

To assay the microbicide activity of these cells, we also evaluate the oxidative burst expression by monocytes from DL patients. A graphical representation of analysis made is shown in the **Figure 1**. During oxidative burst experiments, we used a negative control, unstimulated, and a positive control with PMA+inomicine to verify the reactive species production in the absence of a specific stimulus (**Figure 6**).

When challenged with *L. braziliensis* the classical monocytes rapidly initiate to express oxidative burst molecules (**Figure 6**). An elevation of oxidative burst was observed in few minutes after monocytes first meet with *Leishmania* parasites when compared to Medium (unstimulated) (MFI 422 [53-620] *versus* 1152 [454-1934],  $p < 0.001$ ). This elevation of reactive species due to *Leishmania*-monocytes interaction is also higher when the cultures were stimulated with PMA (MFI 1152 [454-1934] *versus* 700 [81-975], \*  $p < 0.05$ ).

Afterward, we compare the oxidative burst production by monocytes from disseminated and cutaneous leishmaniasis (**Figure 7**). The analysis of spontaneous

production of reactive species did not show differences between the groups of DL and CL. However, after infection with *L. braziliensis*, the monocytes from DL patients produced a lower oxidative burst (MFI 1152 [454-1934]) as compared to cells from DL patients (MFI 2867 [1752-3662]),  $p < 0.01$ .

These findings suggest that the increase in *Leishmania* promastigotas viability might be related to the low oxidative burst production by the monocytes from disseminated leishmaniasis patients.

### **Oxidative burst evaluation after NADPH oxidase and NOS synthase enzymes inhibition in monocytes from disseminated leishmaniasis patients after *L. braziliensis* infection**

To verify whether the oxidative burst production is related to ROS or NO production upon parasites opsonization, the experiments were performed in the presence of inhibitors of NO and ROS pathways. Peripheral blood monocytes initially were treated with DPI or L-NMMA and then the cells were infected and stained with anti-CD14 and anti-CD16 to assess the oxidative burst expression (**Figure 8**).

The inhibition of both pathways led to a significant oxidative burst reduction, but an outstanding inhibition was observed when ROS pathway was inhibited (MFI 1152 [454-1934] *versus* 581 [248-760]),  $p < 0.001$  (**Figure 8**).

We also compare the oxidative burst production after inhibition of ROS and NO pathways between groups of DL and CL patients (**Figure 9**). In CL cases, the inhibition of ROS pathway led to a significant reduction of oxidative burst (MFI 2867 [1752-3662] *versus* 845 [597-1952],  $p < 0.001$ ) while inhibition of NO pathway did not alters that

production (MFI 2867 [1752-3662] *versus* 3022 [2174-3532],  $p= 0.9$ ), indicating that oxidative burst production might be related to ROS production than NO. Nevertheless, the inhibition of ROS or NO reduced the oxidative burst production by monocytes from DL patients (MFI 581 [248-760] and 909 [197-1300], respectively) as compared to production by CL monocytes (MFI 845 [597-1952] and 3022 [2174-3532], respectively),  $p < 0.05$ . These data suggest that these two pathways in DL are most likely involved in the oxidative burst production, with more participation of ROS.

### **Percentage of infection and parasite burden in *L. braziliensis* infected monocytes from DL patients after inhibition of NADPH oxidase and NOS synthase enzymes**

In the attempt to evaluate the contribution which reactive species produced by monocytes have in the control of *L. braziliensis* infection, we performed the inhibition of ROS (NADPH oxidase) and NO (NOS synthase) key molecules in the pathways of oxidative burst. After inhibition of these pathways, the monocytes were infected with *L. braziliensis*. The number of infected cells and parasite burden were estimated by optical microscopy (**Figure 10**).

As previous observation, we notice which the inhibition of ROS led to a reduction of the number of *L. braziliensis* infected monocytes from DL patients and either the parasite burden decreased significantly after 24 hours of infection (63% [46-64] *versus* 33% [32-39] and 184 [99-252] *versus* 98 [84-115], respectively) (**Figure 10**). Contrariwise, the inhibition of ROS that are essential molecules, which probably help controlling the infection, might be related with a favorable environment that may allow the parasite proliferation as well cellular lysis. However, the inhibition of NO in monocytes from these

cases did not change the percentage of infection or the parasite burden in all periods observed.

When compared the groups of patients with DL and CL we observed which the monocytes from DL patients were less infected after 72 hours of culture after both the inhibition of ROS production (6% [0.5-14] *versus* 17% [13-22], \*\*  $p < 0.01$ ) and after inhibiting the formation of NO (26% [13-35] *versus* 39% [37-51], \*  $p < 0.05$ ) as compared to CL (**Figure 11**). The parasite burden, likewise, was similar at the two groups when NADPH oxidase and NOS synthase enzymes were suppressed (**Figure 11**).

### **Evaluation of the role of macrophages in the pathogenesis of disseminated leishmaniasis**

Previous studies have shown which peripheral blood monocyte-derived macrophages from cutaneous and mucosal leishmaniasis did not control the infection and produce higher amounts of inflammatory molecules than macrophages from subclinical individuals (SC) and healthy control subjects (HS) (12). Thus, we also evaluate the role of macrophages in the pathogenesis of disseminated leishmaniasis. The macrophages were infected for different periods and the number of infected cells and the parasite burden are represented in the **Figures 12, A and B**.

The macrophages behaved in the same way as compared to monocytes in relation to infection rates. After 96 hours of culture, the number of infected macrophages was lower in DL patients (7% [2-9]) when compared to macrophages from CL patients (42% [24-60]),  $p < 0.01$  (**Figure 12.A**). The same was observed regarding the parasite burden. The macrophages from DL patients presented a lower number of amastigotes (15 [5-18]) as

compared to CL patients (205 [59-407]),  $p < 0.001$  (**Figure 12.B**).

After that, the production of inflammatory molecules (CCL2, CXCL9, CXCL10 and TNF) by macrophages were either evaluated upon *L. braziliensis* infection (**Figure 13**).

Our data shown that there is no difference in the production of CCL2 chemokine, produced by macrophages, between patients with DL and CL after 96 hours of infection (**Figure 13.A**). Nevertheless, the macrophages from DL patients produced higher levels of TNF (293 pg/mL [87-1079] *versus* 44 pg/mL [6-73],  $p < 0.05$ ), CXCL9 (125494 pg/mL [15887-376642] *versus* 6071 pg/mL [3414-44681],  $p < 0.05$ ) and CXCL 10 (1460 pg/mL [537-14675] *versus* 273 pg/mL [43-1230], \*  $p < 0.05$ ) as compared to the production of these cytokines by macrophages from DL patients (**Figure 13**).

These results suggest which the production of these molecules seems not to be related with the control of the infection since DL is featured by disease dissemination.

### **Correlation between cytokine production by *L. braziliensis* infected macrophages from DL patients and the number of lesions presented**

As previously seen, our data shown which the macrophages from DL patients produce more TFN, CXCL9 and CXCL10 as compared to CL patients. In order to assay whether the elevated production of these cytokines could be associated with the presence of more lesions in DL patients, we performed a correlation analysis between the production of these cytokines and the total number of lesions in these cases.

The TNF cytokine, important in the recruitment and either in the activation of the microbicidal stage of neutrophils and mononuclear phagocytes, was strongly correlated with the number of lesions observed in patients with DL ( $r = 0.79$ ,  $p = 0.02$ ) (**Figure 14.A**).



When analyzed the linear regression model we found an  $r^2 = 0.30$ , that means which 30% of the lesions found in these patients might be explained by the elevated production of TNF by their macrophages. These data suggest that macrophages is probably involved in the pathogenesis of DL producing higher levels of TNF.

Despite the elevated concentrations, there is no association between the production of CXCL9 and CXCL10 chemokines and the number of lesions presented by DL patients ( $r = 0.22$ ;  $p = 0.5$  and  $r = 0.57$ ;  $p = 0.13$ , respectively) (**Figure 14**).

## Discussion

The pathogenesis of the american tegumentary leishmaniasis (ATL) caused by *L. braziliensis* is strongly associated with a strong inflammatory response where there is a high production of IFN- $\gamma$  and TNF and the absence of IL-10, an immune response regulatory cytokine (9, 42, 43). In contrast, in DCL, the complete absence of a Th1 cell response allow the parasite proliferation as well disease dissemination (44). However, in DL, where is observed the presence of hundreds of lesions, the production of the inflammatory cytokines IFN- $\gamma$  and TNF is lower when compared to CL and ML patients (5, 6). Our results confirm earlier observations, which the production of these cytokines by patients with DL is lower as compared to CL patients. Although, the low production of these cytokines did not explain the appearance of several lesions in patients with DL.

The macrophages are the main cells that host *Leishmania* and consequently its survival or death depends on their activation. There is few studies showing the role of the innate immune response in *L. braziliensis* infection. In this study, also evaluate the role of monocytes/macrophages from DL patients in its pathogenesis. Initially we compare the

susceptibility of monocytes from DL and CL patients upon *L. braziliensis* infection. After 72 hours of infection, we observed a reduction of the percentage of infection and the parasite burden as compared to the period of 2 hours. In the period of two hours, there is no difference in the rates between the groups of DL and CL, suggesting that *Leishmania* infect equally the cells of both DL and CL patients. A previous study shown that there was no difference in the infection and the parasite burden of macrophages from CL, ML, SC and HS after 2 hours of infection, showing that there is no difference in the *Leishmania* penetration in these groups (12). However, Bosque et al. (2000), have shown that macrophages from patients with recurrent CL were more permissive to *L. panamensis* infection as compared to asymptomatic individuals and healthy controls (45).

In the present study, after 72 hours of culture, these rates (percentage of infection and parasite burden) in monocytes from DL were lower as compared to the rates observed in monocytes from CL. The study of Giudice et al. (2012) have already demonstrated that after 96 hours the number of infected macrophages and the parasite burden were higher in patients with CL and ML, when compared to SC and HS. These results were unexpected since they suggest that monocytes from DL patients have the ability to control *Leishmania* infection. To prove this hypothesis we proposed a *Leishmania* viability assessment, where we could verify if the reduction of infected cells and parasite burden were associated with parasite control. Initially we observed that there was an increased number of viable promastigotas in the supernatants of monocytes from DL patients after 72 hours of culture as compared to 2 hours. Although without statistical significance, the comparison between DL and CL groups shown that the number of viable parasites was higher in cultures of DL patients after 72 hours of cultures. One possible explanation for these findings is that monocytes from DL patients allow the parasite proliferation, and after 48-72 hours, there is

a disruption of the cells releasing *Leishmania* parasites to the extracellular compartment.

This study also evaluate the oxidative burst production by monocytes from DL patients upon *L. braziliensis* infection. Our data shown that *Leishmania* infection induces the production of reactive species by monocytes from DL patients. However, that production was lower when compared to monocytes from CL. These data suggest that the increased *L. braziliensis* viability is likely related with the low production of reactive species by monocytes from DL patients. It is possible that monocytes from DL patients produce diminished amounts of oxidative burst due to lower expression of recognition receptor to *Leishmania*. Some studies in the lecture have shown that Toll-like receptors (TLRs) have important function as oxidative burst inductor upon *Leishmania* infection. The contact of LPG with Toll like receptor 4 (TLR4) led to the synthesis of NADPH oxidase and increase ROS production (46, 47). Srivastava et al. (2013) also demonstrate that the increased expression of Toll like receptor 2 (TLR2) in macrophages of mice infected with *L. major* was associated with a high oxidative response, especially through LPG recognition by TLR2, with the activation of MyD88 and iNOS expression (48). Recently, a study performed with patients of visceral leishmaniasis shown that the diminished oxidative burst by their monocytes was associated with lower expression of TLR4 (49). The present study also emphasize that DL patients produce lower levels of IFN- $\gamma$  than CL patients do. The IFN- $\gamma$  cytokine is either important to cell activation and the decreased levels of this cytokine could be related to the diminished oxidative burst in patients with DL (50, 51).

While nitric oxide has an important role in the killing of *Leishmania* in mice (33, 37, 52, 53) there are controversies about its role in human tegumentary leishmaniasis and the mechanisms through macrophages can kill *Leishmania* parasites are still unclear (54, 55).

To verify which molecules, ROS or NO, could be related with the oxidative burst we used inhibitors of both pathways. Their inhibition led to a reduction of both pathways with a marked reduction after the inhibition of NADPH oxidase. This data indicates that ROS is the most important radical produced during the oxidative burst in relation to NO by monocytes from DL patients after *L. braziliensis* infection. When comparing the participation of these molecules in the oxidative burst of cells from CL patients we found that ROS is the main contributor. These results corroborates with study performed by Chang et al. (2007) which verified that the oxidative burst in human monocytes upon *L. chagasi* kept unaltered, after inhibition of iNOS, suggesting that the oxidative burst were due to ROS production (56). Gantt et al (2001) also shown that there was difference in *L. chagasi* survival, in murine macrophages, after the inhibition of iNOS (L-NMMA) with increased parasite burden after 48 hours post infection, indicating that NO is crucial in parasite control (34). However, the same was not observed in human monocytes, showing that NO do not have participation in the control of *L. chagasi* infection.

In the present study, the inhibition of ROS production by monocytes from DL patients led to a reduction in the number of infected cells and parasite burden while the inhibition of NO did not alters these rates. These data suggests that ROS is important in *Leishmania* killing and those diminished rates were due to a strong parasite replication that allowed the cell lysis releasing *Leishmania* parasites to the extracellular environment. There are many studies illustrating that ROS is linked with the control of intracellular pathogens. A murine model with *Trypanosoma cruzi* shown that elevated production of ROS by infected macrophages was associated with parasite burden reduction (57). More recently was shown a lower survival of animals with the lack of NADPH oxidase although presented the same parasite burden of wild-type mice. This observation was associated with

an increase of serum levels of nitrate and nitrite, indicating that both are important in *T. cruzi* control (58). In addition, *Toxoplasma gondii* infected macrophages produced elevated amounts of ROS and it was linked with parasite elimination (59). In the model of tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis* has also been documented ROS as anti-leishmania molecules (60, 61). Novais et al. (2014) also shown that *L. braziliensis* induced ROS production by human monocytes and it was followed by infection control (51).

Macrophages also produce molecules that stimulates the inflammatory response, such as cytokines and chemokines. The role of chemokines in *Leishmania* infection includes leukocytes recruitment and even participation on cellular immunity and cell activation (62). The existence of different patterns of chemokines associated with different clinical forms suggest the existence of a protector immune response against *Leishmania* linked to these molecules.

In this study, we evaluated the production of CCL2, linked with monocytes recruitment, macrophages, NK cells, important in the immune response against *Leishmania* (63). Same *in vitro* studies have shown CCL2 inducing the anti-leishmania activity of macrophages and inducing the oxidative burst in humans (64, 65). CCL2 also synergizes with IFN- $\gamma$  to active macrophages to kill *Leishmania* (63). In CL caused by *Leishmania Mexicana*, with self-healing lesions, CCL2 is found in elevated concentrations. On the other hand, that chemokine is found in lower levels in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (66). Most recently, was shown that genic expression of CCL2 in human macrophages infected with *L. panamensis* isolated from a patient with persistent leishmaniasis and from patient with self-healing lesion was higher in cells infected with the isolates from patients with persistent leishmaniasis (67). Our data shown that although *L.*

*braziliensis* infected macrophages from DL patients produce CCL2 there is no difference between patients with DL and CL. The concentrations of CCL2 by macrophages from CL and ML is higher than subclinical individuals or healthy subjects, suggesting that it may participate in the pathogenesis of tegumentary leishmaniasis caused by *L. braziliensis* (12).

The production of CXCL9 and CXCL10 by macrophages from DL patients upon *L. braziliensis* infection was also assessed. Macrophages from disseminated leishmaniasis patients produced elevated amounts of CXCL9 and CXCL10 and that production were higher than observed in CL. CXCL9 and CXCL10, chemokines induced and inductors of IFN- $\gamma$ , respectively, are important in the innate and adaptive immunity against *Leishmania* infection and attract T cells to the infection site. In the cellular infiltrate in tissues of DL were found TCD8<sup>+</sup> and TCD4<sup>+</sup>, macrophages and B cells, but it was similar to what was found in CL patients (10, 11). Tissue analysis of DL and CL patients shown that there is no difference in the expression of both chemokines between these groups. Nevertheless, the production of CXCL9 was higher in serum of patients with DL as compared to CL (6). These findings contrasts with the lower production of IFN- $\gamma$  and TNF by peripheral blood mononuclear cells stimulated with soluble leishmania antigen of these patients. However, that observation could indicate that *Leishmania* T specific cells may be recruited to the infection site and participate in the pathogenesis. One study performed with macrophages from CL and ML infected with *L. braziliensis* shown that macrophages from these patients produce more CXCL9 than subclinical individuals and healthy controls. Most studies involving CXCL9 and CXCL10 have reported that these chemokines have an important role in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases like HTLV-1 infection, multiple sclerosis and hepatitis C (68-70).

TNF is an inflammatory cytokine that have an important role in the immune

response against *Leishmania*. However, in cutaneous leishmaniasis caused by *L.braziliensis* this cytokine is associated with the pathology (43, 71-73). The present study shown that macrophages from DL patients after infection with *L. braziliensis* produce TNF and it is higher compared to macrophages from CL. That observation is very different that was observed in the supernatant from peripheral blood mononuclear cells stimulated with soluble *Leishmania* antigen from these same patients, and the cytokine production is higher than by patients with CL (5, 6).

To verify whether the production of these cytokines were associated with the clinical aspects of DL, we performed same correlations. Interesting we found that TNF was strongly correlated with the number of lesions presents by the patients with DL. This data supports the idea that molecules produced during the innate immune response is associated with the pathogenesis of disseminated leishmaniasis. Although the mechanisms responsible for the dissemination of the disease are not yet completely elucidated, the results of this study contribute to the understanding of the role the innate immune response in the pathogenesis of disseminated leishmaniasis caused by *L.braziliensis*.

## **Conclusions**

The proliferation of *L. braziliensis* in patients with disseminated cutaneous leishmaniasis is likely associated with low production of oxidative burst and the higher production of inflammatory molecules by macrophages may contribute to pathogenesis of the disease.

## List of abbreviations used

CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3
CCL11	chemokine (C-C motif) ligand 11
CD14	Cluster of differentiation 14
CD16	Cluster of differentiation 16
CR1	Complement receptor type 1
CR3	Complement receptor type 3
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
DHR-123	Dihydrorhodamine 123
DPI	Diphenyleneiodonium
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL-10	Interleukin - 10
L-NMMA	L-NG-monomethyl Arginine citrate
LBB	<i>Leishmania braziliensis</i>
LPG	Lipophosphoglycan
MFI	Mean Fluorescence Intensity
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
ROS	Reactive oxygen species
SLA	Soluble <i>Leishmania</i> antigen
SOD	Superoxide dismutase
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PMA	Phorbol myristate acetate
CD4+	Cluster of differentiation 4
CD8+	Cluster of differentiation 8
TLR4	Toll like receptor 4
TLR2	Toll like receptor 2



Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TNF	Factor de necrose tumoral

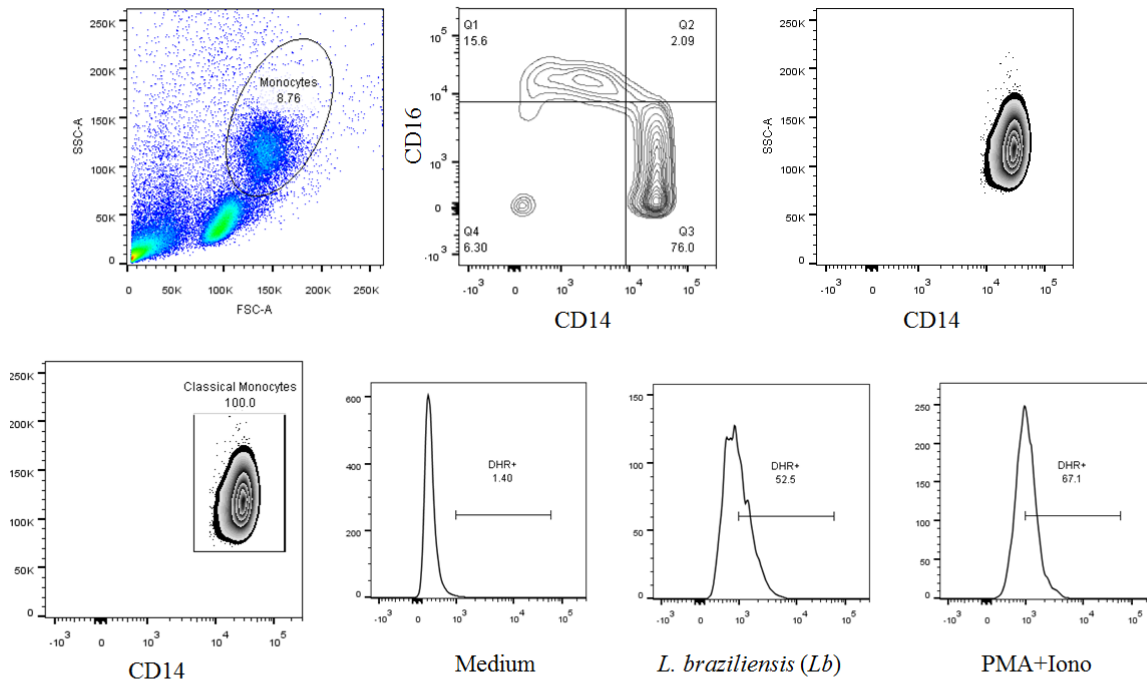
## References

1. Jones TC, Johnson WD, Jr., Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *The Journal of infectious diseases*. 1987;156(1):73-83.
2. Follador I, Araujo C, Bacellar O, Araujo CB, Carvalho LP, Almeida RP, et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2002;34(11):E54-8.
3. Schnorr D, Muniz AC, Passos S, Guimaraes LH, Lago EL, Bacellar O, et al. IFN-gamma production to leishmania antigen supplements the leishmania skin test in identifying exposure to *L. braziliensis* infection. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(12):e1947.
4. Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta tropica*. 1994;56(4):315-25.
5. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *The Journal of infectious diseases*. 2002;186(12):1829-34.
6. Machado PR, Rosa ME, Costa D, Mignac M, Silva JS, Schriefer A, et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2011;105(8):438-44.
7. Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *The Journal of experimental medicine*. 1988;168(5):1675-84.
8. Taylor AP, Murray HW. Intracellular antimicrobial activity in the absence of interferon-gamma: effect of interleukin-12 in experimental visceral leishmaniasis in interferon-gamma gene-disrupted mice. *The Journal of experimental medicine*. 1997;185(7):1231-9.
9. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro De Jesus A, Dutra WO, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and immunity*. 2002;70(12):6734-40.
10. Vieira MG, Oliveira F, Arruda S, Bittencourt AL, Barbosa AA, Jr., Barral-Netto M, et al. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002;97(7):979-83.
11. Dantas ML, de Oliveira JM, Carvalho L, Passos ST, Queiroz A, Guimaraes LH, et al. Comparative analysis of the tissue inflammatory response in human cutaneous and disseminated leishmaniasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2014;109(2):202-9.
12. Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, Carvalho LP, Delavechia T, Carvalho EM, et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC infectious diseases*. 2012;12:75.
13. Buchmuller Y, Mauel J. Studies on the mechanisms of macrophage activation: possible involvement of oxygen metabolites in killing of *Leishmania enrietti* by activated mouse macrophages. *Journal of the Reticuloendothelial Society*. 1981;29(3):181-92.
14. Murray HW, Cartelli DM. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. *The Journal of clinical investigation*. 1983;72(1):32-44.
15. Alexander J, Vickerman K. Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *The Journal of protozoology*. 1975;22(4):502-8.
16. Chang KP, Dwyer DM. Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. *Science*. 1976;193(4254):678-80.
17. Lewis DH, Peters W. The resistance of intracellular *Leishmania* parasites to digestion by lysosomal enzymes. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 1977;71(3):295-312.
18. Chang KP, Dwyer DM. *Leishmania donovani*. Hamster macrophage interactions in vitro: cell entry, intracellular survival, and multiplication of amastigotes. *The Journal of experimental medicine*. 1978;147(2):515-30.
19. Dermine JF, Goyette G, Houde M, Turco SJ, Desjardins M. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. *Cellular microbiology*. 2005;7(9):1263-70.

20. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*. 1995;270(5234):296-9.
21. Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, et al. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(1):217-21.
22. Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, et al. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell*. 2005;122(2):221-33.
23. Yeligar SM, Harris FL, Hart CM, Brown LA. Glutathione attenuates ethanol-induced alveolar macrophage oxidative stress and dysfunction by downregulating NADPH oxidases. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2014;306(5):L429-41.
24. Ruiz-Ramirez A, Ortiz-Balderas E, Cardozo-Saldana G, Diaz-Diaz E, El-Hafidi M. Glycine restores glutathione and protects against oxidative stress in vascular tissue from sucrose-fed rats. *Clinical science*. 2014;126(1):19-29.
25. Mizrahi A, Berdichevsky Y, Ugolev Y, Molshanski-Mor S, Nakash Y, Dahan I, et al. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase complex: chimeric constructs derived from the cytosolic components as tools for exploring structure-function relationships. *Journal of leukocyte biology*. 2006;79(5):881-95.
26. Channon JY, Roberts MB, Blackwell JM. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. *Immunology*. 1984;53(2):345-55.
27. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1992;298(2):446-51.
28. Zingarelli B, O'Connor M, Wong H, Salzman AL, Szabo C. Peroxynitrite-mediated DNA strand breakage activates poly-adenosine diphosphate ribosyl synthetase and causes cellular energy depletion in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *Journal of immunology*. 1996;156(1):350-8.
29. Xia Y, Zweier JL. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(13):6954-8.
30. Van Assche T, Deschacht M, da Luz RA, Maes L, Cos P. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free radical biology & medicine*. 2011;51(2):337-51.
31. Linares E, Giorgio S, Mortara RA, Santos CX, Yamada AT, Augusto O. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. *Free radical biology & medicine*. 2001;30(11):1234-42.
32. Khouri R, Bafica A, Silva Mda P, Noronha A, Kolb JP, Wietzerbin J, et al. IFN-beta impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. *Journal of immunology*. 2009;182(4):2525-31.
33. Evans TG, Thai L, Granger DL, Hibbs JB, Jr. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *Journal of immunology*. 1993;151(2):907-15.
34. Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jeronimo SM, Nascimento ET, et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *Journal of immunology*. 2001;167(2):893-901.
35. Blos M, Schleicher U, Soares Rocha FJ, Meissner U, Rollinghoff M, Bogdan C. Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania major* infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. *European journal of immunology*. 2003;33(5):1224-34.
36. Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Journal of immunology*. 1990;144(12):4794-7.
37. Assreuy J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'Donnell CA, Liew FY, et al. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *European journal of immunology*. 1994;24(3):672-6.
38. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free radical biology & medicine*. 2009;47(4):344-56.
39. Ghosh S, Goswami S, Adhya S. Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage. *The Biochemical journal*. 2003;369(Pt 3):447-52.
40. Spath GF, Garraway LA, Turco SJ, Beverley SM. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(16):9536-41.

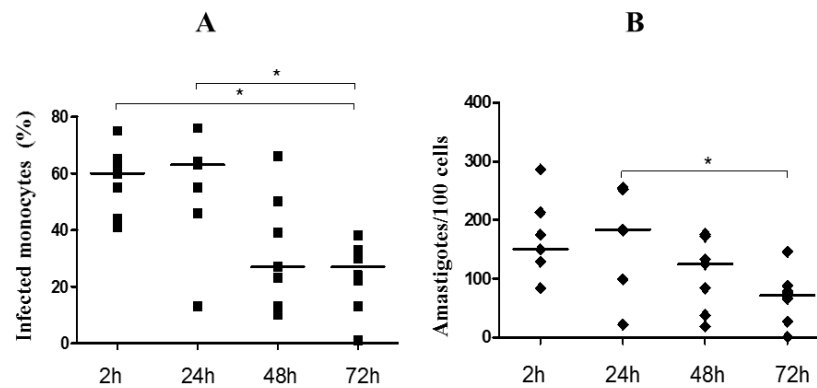
41. Cupolillo E, Grimaldi G, Jr., Momen H. A general classification of New World Leishmania using numerical zymotaxonomy. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1994;50(3):296-311.
42. Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 1998;31(1):143-8.
43. Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett*. 2005;101(2):226-30.
44. Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 1996;84(2):188-94.
45. Bosque F, Saravia NG, Valderrama L, Milon G. Distinct innate and acquired immune responses to Leishmania in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to *L. (Viannia) panamensis* infection. *Scandinavian journal of immunology*. 2000;51(5):533-41.
46. Sasada M, Pabst MJ, Johnston RB, Jr. Activation of mouse peritoneal macrophages by lipopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase. *The Journal of biological chemistry*. 1983;258(16):9631-5.
47. Gill R, Tsung A, Billiar T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free radical biology & medicine*. 2010;48(9):1121-32.
48. Srivastava S, Pandey SP, Jha MK, Chandel HS, Saha B. Leishmania expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. *Clinical and experimental immunology*. 2013;172(3):403-9.
49. Roy S. A Defective Oxidative Burst and Impaired Antigen Presentation are Hallmarks of Human Visceral Leishmaniasis. 2014.
50. Murray HW, Delph-Etienne S. Roles of endogenous gamma interferon and macrophage microbicidal mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Infection and immunity*. 2000;68(1):288-93.
51. Novais FO, Nguyen BT, Beiting DP, Carvalho LP, Glennie ND, Passos S, et al. Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. *The Journal of infectious diseases*. 2014;209(8):1288-96.
52. Stenger S, Thuring H, Rollinghoff M, Bogdan C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *The Journal of experimental medicine*. 1994;180(3):783-93.
53. Murray HW, Teitelbaum RF. L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. *The Journal of infectious diseases*. 1992;165(3):513-7.
54. Fang FC, Nathan CF. Man is not a mouse: reply. *Journal of leukocyte biology*. 2007;81(3):580.
55. Schneemann M, Schoeden G. Macrophage biology and immunology: man is not a mouse. *Journal of leukocyte biology*. 2007;81(3):579; discussion 80.
56. Chang HK, Thalhofer C, Duerkop BA, Mehling JS, Verma S, Gollob KJ, et al. Oxidant generation by single infected monocytes after short-term fluorescence labeling of a protozoan parasite. *Infection and immunity*. 2007;75(2):1017-24.
57. Gupta S, Dhiman M, Wen JJ, Garg NJ. ROS signalling of inflammatory cytokines during *Trypanosoma cruzi* infection. *Advances in parasitology*. 2011;76:153-70.
58. Santiago HC, Gonzalez Lombana CZ, Macedo JP, Utsch L, Tafuri WL, Campagnole-Santos MJ, et al. NADPH phagocyte oxidase knockout mice control *Trypanosoma cruzi* proliferation, but develop circulatory collapse and succumb to infection. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(2):e1492.
59. Shrestha SP, Tomita T, Weiss LM, Orlofsky A. Proliferation of *Toxoplasma gondii* in inflammatory macrophages in vivo is associated with diminished oxygen radical production in the host cell. *International journal for parasitology*. 2006;36(4):433-41.
60. Degrossoli A, Arrais-Silva WW, Colhone MC, Gadelha FR, Joazeiro PP, Giorgio S. The influence of low oxygen on macrophage response to *Leishmania* infection. *Scandinavian journal of immunology*. 2011;74(2):165-75.
61. Fonseca-Silva F, Inacio JD, Canto-Cavalheiro MM, Almeida-Amaral EE. Reactive oxygen species production by quercetin causes the death of *Leishmania amazonensis* intracellular amastigotes. *Journal of natural products*. 2013;76(8):1505-8.

62. Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Barral-Netto M, Barral A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends in parasitology*. 2006;22(1):32-40.
63. Ritter U, Moll H. Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of leishmania major by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4. *European journal of immunology*. 2000;30(11):3111-20.
64. Rollins BJ, Walz A, Baggiolini M. Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood*. 1991;78(4):1112-6.
65. Moll H. The role of chemokines and accessory cells in the immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Behring Institute Mitteilungen*. 1997(99):73-8.
66. Ritter U, Moll H, Laskay T, Brocker E, Velazco O, Becker I, et al. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*. 1996;173(3):699-709.
67. Navas A, Vargas DA, Freudzon M, McMahon-Pratt D, Saravia NG, Gomez MA. Chronicity of dermal leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis* is associated with parasite-mediated induction of chemokine gene expression. *Infection and immunity*. 2014;82(7):2872-80.
68. Guerreiro JB, Santos SB, Morgan DJ, Porto AF, Muniz AL, Ho JL, et al. Levels of serum chemokines discriminate clinical myelopathy associated with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) disease from HTLV-1 carrier state. *Clinical and experimental immunology*. 2006;145(2):296-301.
69. Mahad DJ, Howell SJ, Woodroffe MN. Expression of chemokines in the CSF and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2002;72(4):498-502.
70. Wald O, Weiss ID, Galun E, Peled A. Chemokines in hepatitis C virus infection: pathogenesis, prognosis and therapeutics. *Cytokine*. 2007;39(1):50-62.
71. Da-Cruz AM, de Oliveira MP, De Luca PM, Mendonca SC, Coutinho SG. Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1996;91(2):225-9.
72. Bafica A, Oliveira F, Freitas LA, Nascimento EG, Barral A. American cutaneous leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline. *International journal of dermatology*. 2003;42(3):203-7.
73. Machado PR, Lessa H, Lessa M, Guimaraes LH, Bang H, Ho JL, et al. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;44(6):788-93.

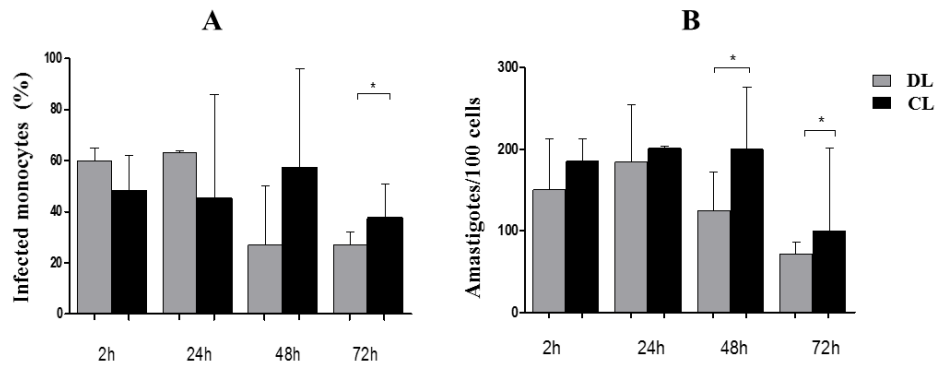


**Figure 1. Representative plots used for the analysis of monocyte expressing CD14 and oxidative burst production.**

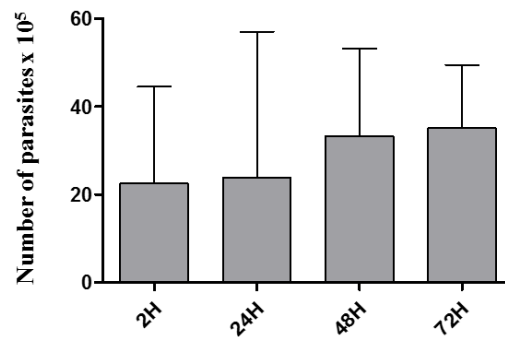
Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained and stimulated with dihydrohodamine 123 (DHR) for 10 minutes. Monocytes were infected with *L. braziliensis* at a 5:1 ration for 20 minutes and stained for CD14 as indicated on materials and methods or stimulated with Phorbol-myristate-acetate (PMA) (10 ng/mL) + Ionomycin, as a positive control of reactive species production.



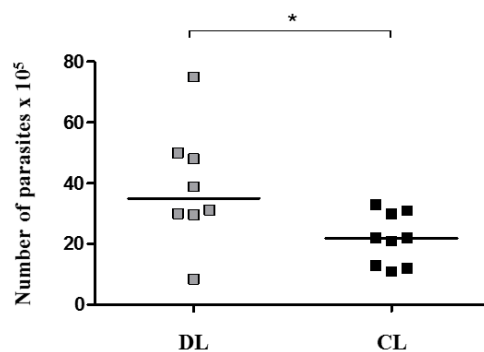
**Figure 2. Number of infected cells and parasite load of monocytes from DL patients upon *L. braziliensis* infection.** Peripheral blood monocytes from DL patients (n=8) were infected with *L. braziliensis* in a ratio of 5:1 during the periods of 2, 24, 48 and 72 hours of infection. Figure A represents the percentage of *L. braziliensis* infected monocytes from DL patients. Figure B represents the number of amastigotes per 100 cells. Percentage of infection and parasite burden analyses were assessed through optical microscopy. The data are represented as median and interquartile range. P values were obtained through the statistical test of Kruskal-Wallis with Dunn's post test (\* p < 0,05).



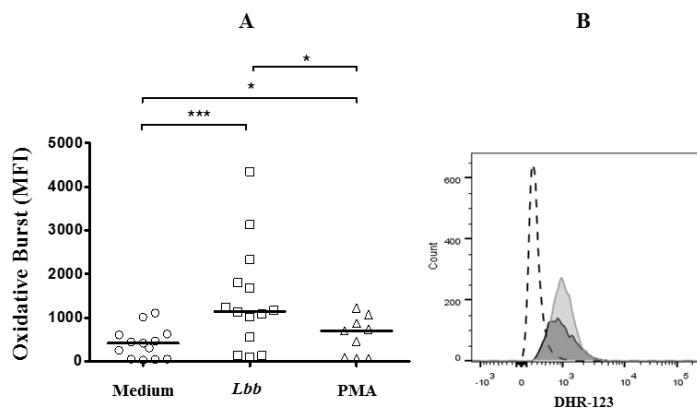
**Figure 3. Number of infected cells and parasite load of monocytes from DL and CL patients upon *L. braziliensis* infection.** Percentage of infection and parasite load in monocytes from DL (n=8) and CL (n=16) patients infected with *L. braziliensis*. (A) Percentage of infected cells. (B) Number of amastigotes per 100/cells. The gray bars represents DL patients and the black bars represents CL patients. Percentage of infection and parasite burden analyses were assessed by optical microscopy. The data are represented as median and interquartile range. P values were obtained through statistical test of Mann-Whitney (\* p<0,05).



**Figure 4. Evaluation of *L. braziliensis* viability in cultures of infected monocytes.** Peripheral blood monocytes from DL patients (n=8) were infected with *L. braziliensis* (5:1), after 2 hours the cultures were washed to take off the extracellular promastigotas and the medium were replaced with Schneider and the cells were kept in the cultures for 2, 24, 48, and 72 hours. The number of viable promastigotas was found through counting of the motile parasites in the supernatants. The data are represented as median and interquartile range. For statistical analyses was used the test of Kruskal-Wallis, p >0,05.

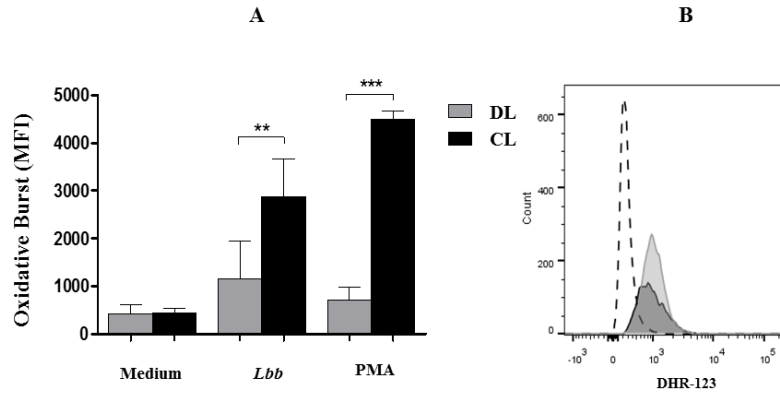


**Figure 5. Evaluation of *L. braziliensis* viability in cultures of infected monocytes.** Representation of viability analysis of *L. braziliensis* promastigotas in supernatants of cultures of monocytes from patients with DL (n=8) and CL (n=9). Peripheral blood monocytes were infected with *L. braziliensis* in a ratio of 5:1 and after 2 hours the cultures were washed to take off the extracellular parasites which do not infected the cells. Then the medium was replaced with Schneider's medium and the cells were kept in culture for 72 hours. The number of viable promastigotas were obtained by counting of motile parasites in the supernatants. The results are expressed as median and interquartile range. The groups were compared by the statistical test of Mann-Whitney (\* p=0.05).

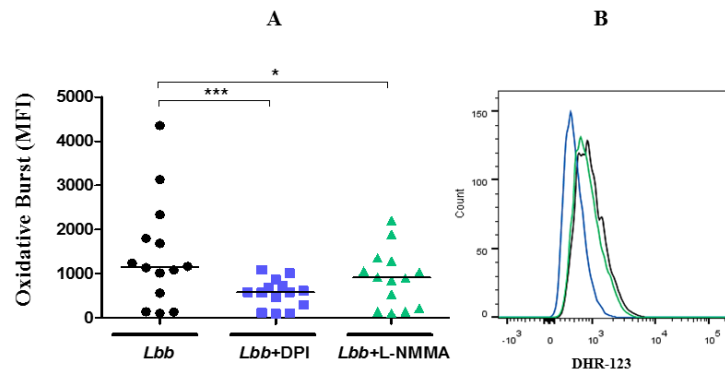


**Figure 6. Evaluation of oxidative burst expression by monocytes from disseminated leishmaniasis patients.** Peripheral blood monocytes from DL (n=14) were treated with DHR-123 and then infected with *L. braziliensis* (*Lbb*). Monocytes were also stained with anti-CD14 and anti-CD16 antibodies and the analysis were made by flow cytometry. Figure A represents the oxidative burst expression by monocytes from DL patients after infection with *L. braziliensis*, PMA or medium. Figure B show the histograms of flow cytometry analysis. The histogram with dashed line represents the oxidative burst in unstimulated cells, whereas the histogram with continuous line in black represents the oxidative burst after infection with *L. braziliensis*, and the gray line show the oxidative burst expression after stimulus with PMA. The data are expressed in MFI of oxidative burst. All data are represented in median and interquartile range. The oxidative burst expression were compared through Wilcoxon test (\*\*\*) p < 0,001; \* p < 0,05).

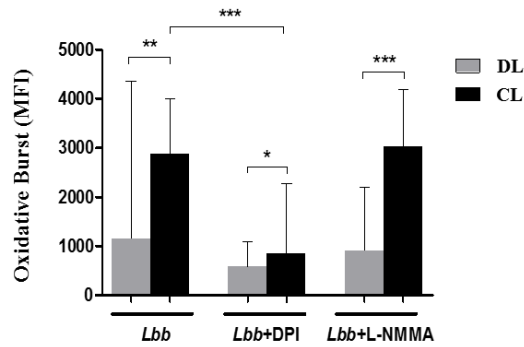




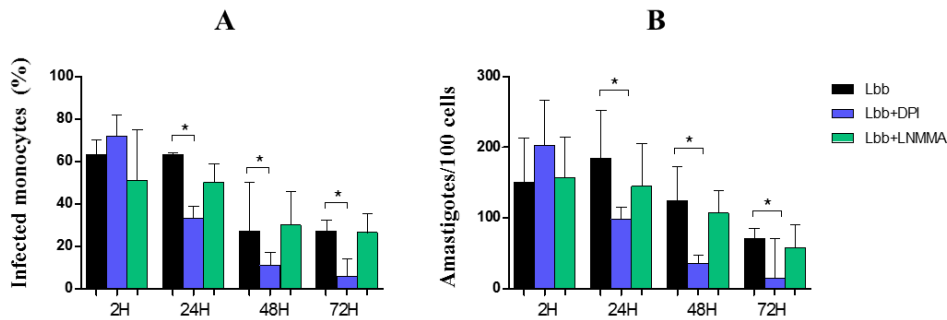
**Figure 7. Oxidative burst expression by monocytes from disseminated and cutaneous leishmaniasis after infection with *L. braziliensis* by flow cytometry.** Peripheral blood monocytes from DL (n=13) and CL (n=11) patients were stained with anti-CD14, anti-CD16 and DHR. The monocytes were also stimulated with *L. braziliensis* (*Lbb*) or PMA. Figure A show the oxidative burst expression in patients with DL and CL in different culture conditions. Histograms of analysis are shown in Figure B. Dashed line histogram represents the oxidative burst without stimulus; histogram with continuous line in black show the oxidative burst after *Leishmania*-monocytes interaction; whereas continuous line in gray represents the oxidative burst after PMA stimulus. The data are expressed as MFI of oxidative burst. All data are represented as median and interquartile range and P value were obtained through the statistical test of Mann-Whitney (\*\* $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).



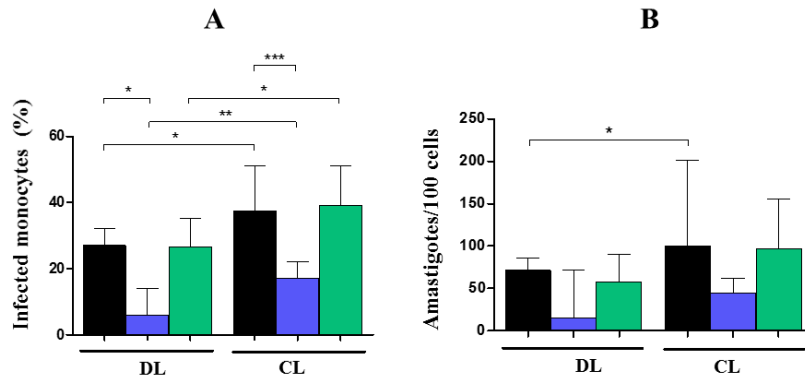
**Figure 8. Oxidative burst evaluation after NADPH oxidase and NOS synthase enzymes inhibition in monocytes from disseminated leishmaniasis patients after *L. braziliensis* infection.** Monocytes from DL patients (n=14) were treated with DHR-123, afterward was added NADPH oxidase (DPI) and NOS synthase (L-NMMA) inhibitor to the cultures. The cells were infected with *L. braziliensis* and stained with anti-CD14 and anti-CD16 antibodies and data analyzed through flow cytometry. Figure A show the expression of oxidative burst after inhibition of pathways of oxidative burst. Analysis representative histograms are shown in Figure B. Black line represents the oxidative burst upon *Leishmania*-monocytes interaction and the blue line illustrate the oxidative burst production upon *Leishmania*-monocytes interaction and with DPI treatment, while the green line represents the oxidative burst production upon *Leishmania*-monocytes interaction and with L-NMMA treatment. All data are represented as MFI of oxidative burst. The values are shown as median and interquartile range. The groups were compared using the statistical test of Wilcoxon (\*\* $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,05$ ).



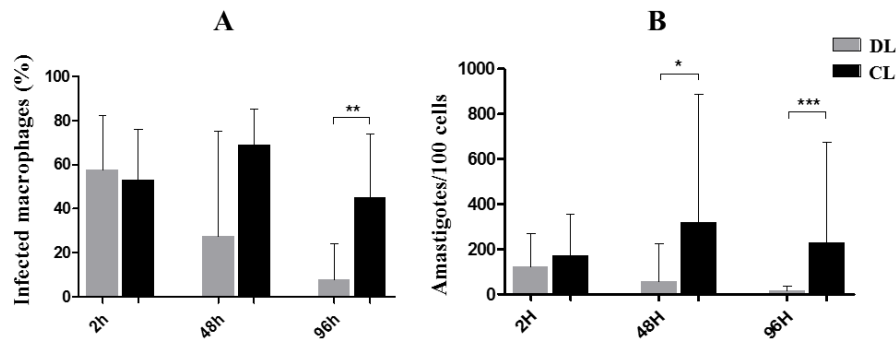
**Figure 9. Oxidative burst expression after inhibition of NADPH oxidase and NOS synthase enzymes in monocytes from DL and CL patients after *L. braziliensis* infection.** Monocytes from DL (n=14) and CL (n=16) were treated with DHR-123 and then were added NADPH oxidase (DPI) and NOS synthase (L-NMMA) inhibitors to the cultures. These cells were also infected with *L. braziliensis* and the monocytes were stained with anti-CD14 and anti-CD16 antibodies and the data analysed through flow cytometry. Results are expressed as MFI of oxidative burst. Gray bars represents DL patients while black bars show patients with CL. The values are represented as median and interquartile range. P values were obtained through Mann-Whitney test (\*\* $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ).



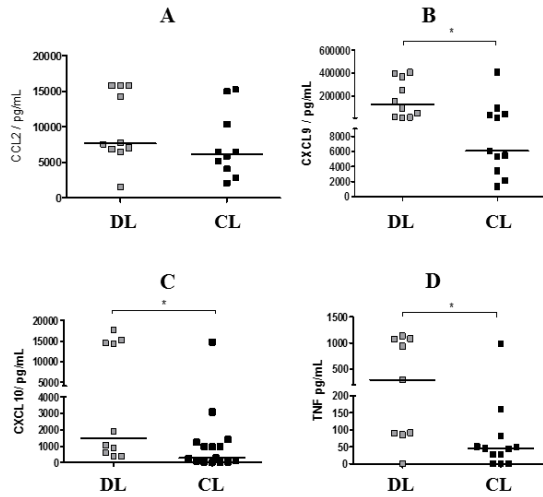
**Figure 10. Evaluation of the percentage of infection and parasite burden in *L. braziliensis* infected monocytes from DL patients after inhibition of NADPH oxidase and NOS synthase enzymes.** Peripheral blood monocytes from DL patients (n=8) were treated with DPI for inhibition of ROS and L-NMMA for inhibition of NO production. The cells were infected for 2, 24, 48 and 72 hours to estimate the percentage of infected cells (Figure A) and parasite burden (Figure B). The results are expressed as median and interquartile range. The groups were compared through the statistical test of Mann-Whitney (\*  $p < 0,05$ ).



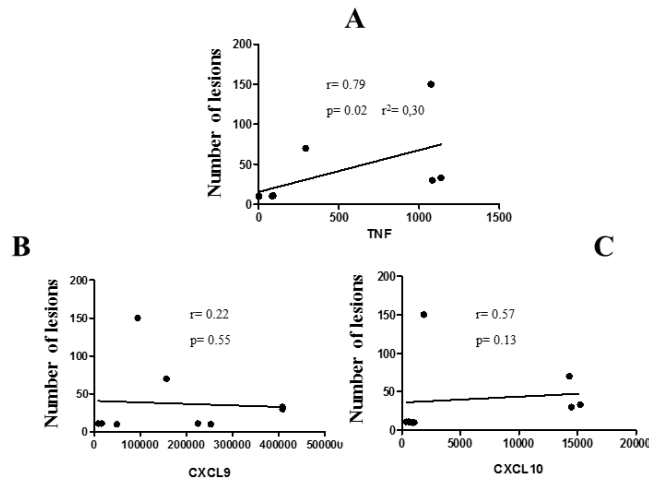
**Figure 11. Percentage of infection and parasite burden evaluation in monocytes from DL and CL patients infected with *L. braziliensis* after NADPH oxidase and NOS synthase inhibition.** Peripheral blood monocytes from DL (n=8) and CL (n=16) patients were treated with DPI for inhibition of ROS and L-NMMA for inhibition of NO. The cells were incubated for more 72 hours to estimate the percentage of infected cells (Figure A) and parasite burden (Figure B). All the values are expressed as median and interquartile range. The groups were compared using the statistical tests of Mann-Whitney and Wilcoxon (\*\* $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ).



**Figure 12. Percentage of infection and parasite burden evaluation in macrophages from DL and CL patients after *L. braziliensis* infection.** Peripheral blood monocytes from DL (n=7) and CL (n=11) patients were isolated and then submitted to a 6 days of culture in Lab-Tek Chamber Slide plates for their differentiation into macrophages. Therefore, the macrophages were infected with *L. braziliensis* and submitted to more 2, 48 and 96 hours of culture. The Figure A show the number of infected cells and the Figure B represents the parasite burden. The values are expressed as median and interquartile range. The comparisons between groups were done with the Mann-Whitney test (\*\* $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ).



**Figure 13. Cytokines and chemokines production by macrophages from DL and CL patients upon *L. braziliensis* infection.** Peripheral blood monocytes from DL and CL patients were isolated and then submitted for 6 days of culture in Lab-Tek Chamber Slide plates for their differentiation into macrophages. Therefore, the macrophages were infected with *L. braziliensis* and were kept in culture for more 2, 48 and 96 hours. The evaluation of the production of CCL2 (A), CXCL9 (B), CXCL10 (C) and TNF (D) were performed by ELISA after 96 hours of culture. All values are expressed as median and interquartile range. The comparisons between groups were done through the statistical test of Mann-Whitney (\*  $p < 0,05$ ).



**Figure 14. Correlation between the cytokines produced by *L. braziliensis* infected macrophages from DL patients and the number of lesions.** Macrophages from DL patients were infected with *L. braziliensis* and cultured for 48 hours for dosage of cytokines by ELISA. The Figure A represents the correlation between TNF and the number of lesions, whereas the Figures B and C illustrate the correlations done between CXCL9 and CXCL10 and the number of lesions in DL patients. The number of lesions were obtained by counting of the total lesions in DL patients. The  $r$  value represents the Spearman's correlation coefficient and  $r^2$  represents the coefficient of determination obtained by linear regression.

**Table 1. Epidemiological, clinical, and immunological features of disseminated leishmaniasis patients.**

	<b>Patients DL</b>	<b>Patients CL</b>	<b>P value</b>
<b>Number</b>	21	16	-
<b>Age (years)</b>	43 (23-64)	41 (14-56)	0,6
<b>Gender</b>	18 M; 3 F	6 M; 8 F	-
<b>Number of lesions</b>	16 (8-200)	1 (1-2)	< 0,0001
<b>DTH</b>	12,7 x 11,3 mm	17,14x16 mm	< 0,05
<b>Mucosal involvment</b>	14% ( 2/14)	0/16	-
<b>IFN-<math>\gamma</math> production</b>	344 pg/mL	1180 pg/mL	< 0,01
<b>TNF production</b>	112 pg/mL	1700 pg/mL	< 0,01
<b>IL-10 production</b>	86 pg/mL (5,7-330)	90 pg/mL (22-228)	0,7
<b>Therapeutic failure ( more than one cycle of glucantime )</b>	26,6% (4/15)	12,5% (1/8)	-

## **VI. RESULTADOS**

### **VI. 1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS DA POPULAÇÃO ESTUDADA**

A população estudada foi composta por 37 pacientes, sendo 21 com leishmaniose disseminada e 16 com leishmaniose cutânea. Os pacientes residiam na região pertencente ao distrito de Presidente Tancredo Neves, e buscavam atendimento ao Centro de Referência no vilarejo de Corte de Pedra. Uma tabela com os aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos representativa da população estudada pode ser observada logo abaixo (Tabela 1).

**Tabela 1.** Aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos dos pacientes com leishmaniose disseminada.

	<b>Pacientes LD</b>	<b>Pacientes LC</b>	<b>Valor de P</b>
<b>Número</b>	21	16	-
<b>Idade (anos)</b>	43 (23-64)	41 (14-56)	0,6
<b>Gênero</b>	18 M; 3 F	6 M; 8 F	-
<b>Número de lesões</b>	16 (8-200)	1 (1-2)	< 0,0001
<b>DTH</b>	12,7 x 11,3 mm	17,14x16 mm	< 0,05
<b>Envolvimento de mucosa</b>	14% ( 2/14)	0/16	-
<b>Produção de IFN-<math>\gamma</math></b>	344 pg/mL	1180 pg/mL	< 0,01
<b>Produção de TNF</b>	112 pg/mL	1700 pg/mL	< 0,01
<b>Produção de IL-10</b>	86 pg/mL (5,7-330)	90 pg/mL (22-228)	0,7
<b>Falha Terapêutica ( mais de 1 série de glucantime )</b>	26,6% (4/15)	12,5% (1/8)	-

Como pode ser observado, nesta população, o número de pacientes do gênero masculino predomina dentre aqueles com a forma disseminada da doença.

Em relação ao tamanho da intradermorreação (DTH), observamos diferença no tamanho da reação formada entre os pacientes com a forma disseminada e cutânea da doença (12,7 x 11,3 mm *versus* 17,14 x 16 mm,  $p < 0,05$ ). Enquanto que todos os pacientes com LC reagiram ao teste do DTH, foi possível observar que 30% dos pacientes com LD tiveram resultados negativos para a reação do DTH. O envolvimento da mucosa também foi maior nos pacientes com LD como também observado anteriormente (TURETZ et al., 2002; MACHADO et al., 2011).

A produção de IFN- $\gamma$  e de TNF por PBMCs foi menor quando comparado com a produção observada na LC, confirmando observações anteriores em relação à produção dessas citocinas (TURETZ et al., 2002; MACHADO et al., 2011). A produção reduzida de citocinas inflamatórias não justifica o fato de os pacientes com LD permitirem a disseminação do parasito, uma vez que se observa uma resposta exacerbada a nível tecidual, com a presença de diversas lesões, que não consegue controlar a infecção.

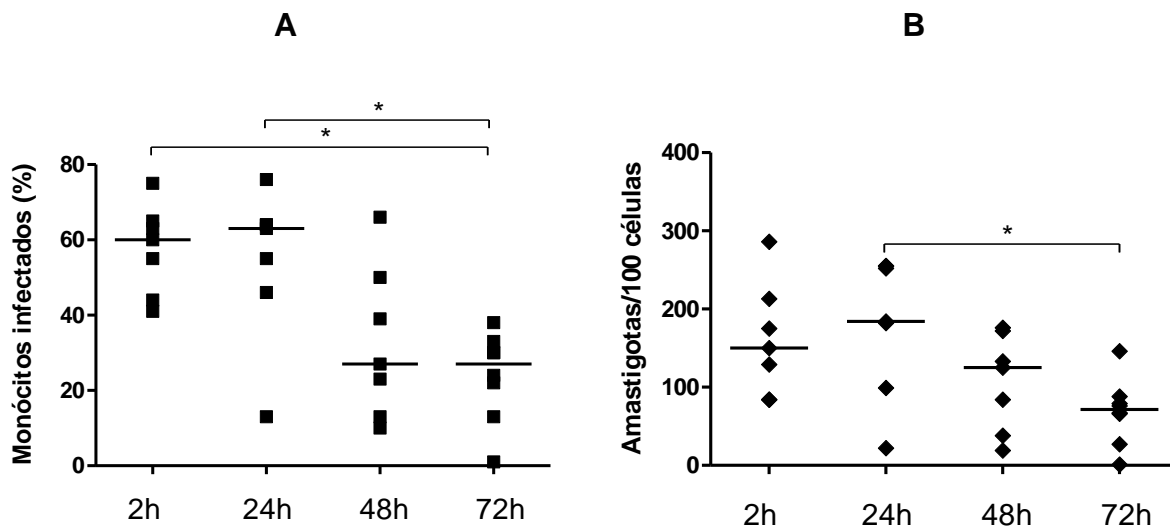
Um dos problemas observados em relação ao manejo da LD é o elevado número de pacientes com a necessidade de dar continuidade ao tratamento com um ou mais ciclos de antimonial (TURETZ et al., 2002). Nossos dados mostraram que os pacientes com LD exibem falha terapêutica cerca de duas vezes superior ao que se observa nos pacientes com LC (26,6 *versus* 12,5%).

## VI. 2. AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE INFECÇÃO E DE CARGA PARASITÁRIA EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE DISSEMINADA APÓS INFECÇÃO COM *L. braziliensis*

Com o intuito de avaliar a suscetibilidade dos monócitos de pacientes com LD à infecção com *L. braziliensis*, os monócitos foram infectados com o parasito na proporção de 5:1 durante os períodos de 2, 24, 48 e 72 horas. O número de células infectadas e da carga parasitária foi estimado por microscopia óptica após a realização da técnica de Cytospin.

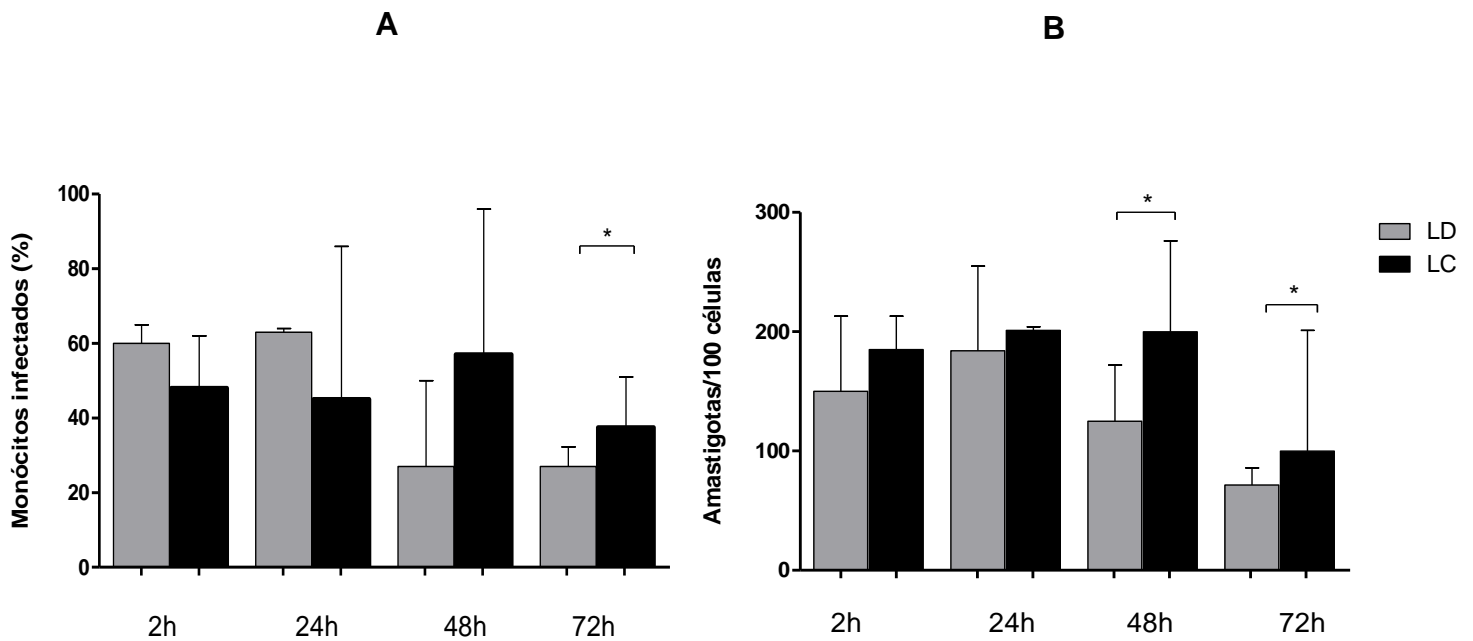
A cinética de infecção realizada mostrou que os monócitos de pacientes com LD mantiveram o seu percentual de infecção e a carga parasitária praticamente inalterada após 24 horas de cultura (**Figura 4**). Entretanto, com 48 horas de infecção observou-se uma diminuição nestes indicadores de infecção, apesar de não ser registrada nenhuma diferença estatisticamente significativa. De maneira inesperada, registrou-se que os monócitos de pacientes com LD encontravam-se menos infectados (60 % [44-65] versus 27 % [15-32],  $p < 0,05$ ) e com menor número de carga parasitária (150 [84-213] versus 71 [36-85],  $p < 0,01$ ) após 72 horas de infecção em relação ao período de 2 horas.





**Figura 4. Avaliação da suscetibilidade de monócitos de pacientes com LD à infecção com *L. braziliensis*.** Monócitos do sangue periférico de pacientes com LD (n=8) foram infectados com *L. braziliensis* na proporção de 5:1 durante os períodos de 2, 24, 48, e 72 horas de infecção. A figura A representa o percentual de monócitos de pacientes com LD infectados com *L. braziliensis*. A figura B representa o número de amastigotas em 100 células. A análise do percentual de infecção e de carga parasitária foi realizada através da técnica de microscopia óptica. Os resultados estão representados em mediana e amplitude interquartil. Os valores de P foram obtidos através do teste estatístico de Kruskal-Wallis com o pós teste de Dunn's (\* p<0,05).

Ao comparar os percentuais de infecção e a carga parasitária entre monócitos de pacientes com LD e LC, observou-se que monócitos de pacientes com LD encontravam-se com menor percentual de infecção (27% [15-32]) e de carga parasitária (71 [36-85]), após 72 horas de infecção quando comparados com os LC (37 % [28-51]) ( $p < 0,02$ ); (100 [80-201]) ( $p < 0,05$ ) (**Figura 5**).



**Figura 5. Avaliação da suscetibilidade de monócitos de pacientes com LD e LC à infecção com *L. braziliensis*.** Percentual de infecção e carga parasitária em monócitos de pacientes com LD (n= 8) e LC (n= 16) infectados com *L. braziliensis*. (A) Percentual de células infectadas. (B) Número de amastigotas por 100 células. As barras em cinza representam os pacientes com LD e as barras em preto os pacientes com LC. A análise do percentual de infecção e de carga parasitária foi realizada através da técnica de microscopia óptica. Os resultados estão representados em mediana e amplitude interquartil. Os valores de P foram obtidos através do teste estatístico de Mann-Whitney (\* p<0,05).

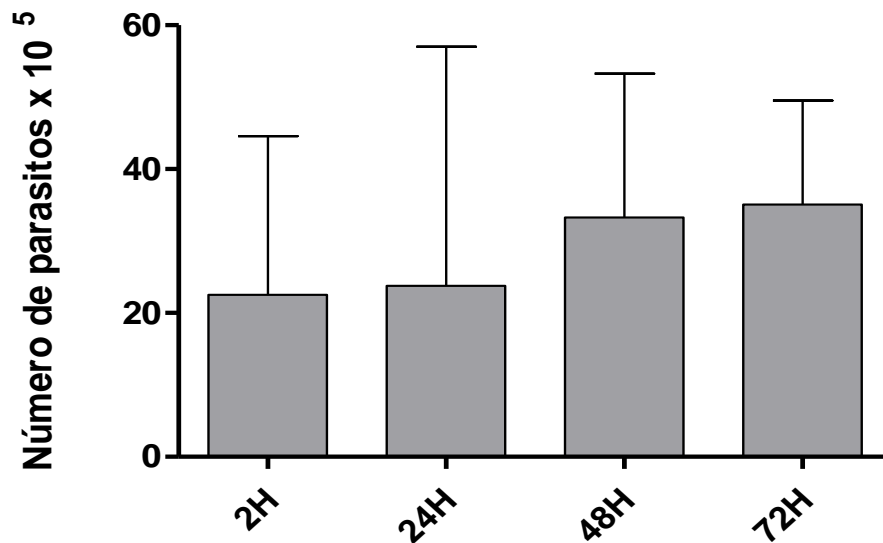
### VI. 3. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DA *L. braziliensis* EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LD INFECTADOS COM O PARASITO

A observação que os monócitos de pacientes com LD eram menos infectados e tinham uma menor carga parasitária em relação aos pacientes com LC, de alguma forma foi um pouco inesperada também, desde quando esses dados podem sugerir que as células desses pacientes conseguem controlar a infecção.

Para comprovar esses dados decidiu-se investigar se a diminuição do número de células infectadas e da carga parasitária estava associada com o controle da infecção pelos monócitos. Para isso foi realizado o ensaio de viabilidade, onde após 2 horas de infecção as culturas de monócitos foram lavadas para a retirada das promastigotas que não conseguiram se albergar no interior dos monócitos. O meio foi substituído pelo meio Schneider e as células permaneceram em cultura por mais 2, 24, 48, e 72 horas para o acompanhamento da cinética de proliferação do parasito nos sobrenadantes (NOVAIS et al., 2009; SILVA-SANTOS et al., 2013).

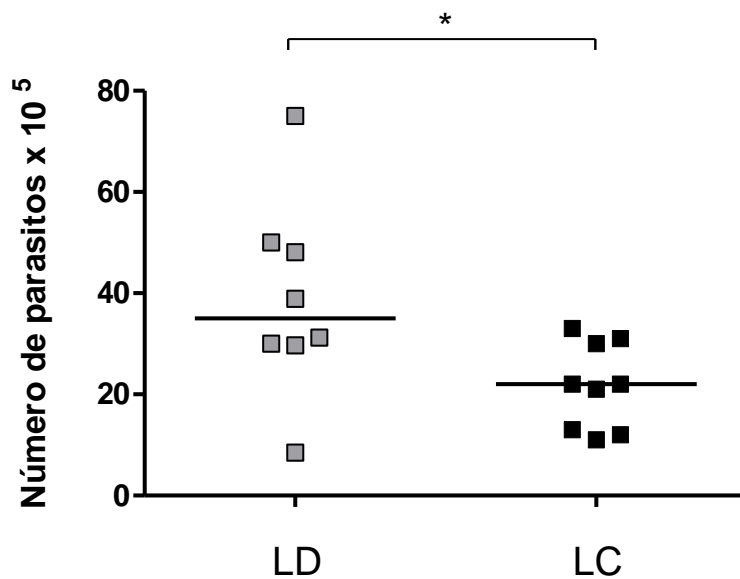
Ao observar a proliferação das promastigotas nos sobrenadantes de culturas de monócitos infectados de pacientes com LD pôde-se observar um aumento das formas promastigotas do parasito, que provavelmente promoveram a lise celular e migraram para o meio extracelular continuando a proliferar nos sobrenadantes das culturas destas células. Entretanto, não encontramos diferença estatística entre os tempos de infecção utilizados (**Figura 6**). Embora não tenhamos encontrado diferença estatística devemos atentar para o significado

biológico da presença de mais parasitos viáveis no meio extracelular após 72 horas de infecção ( $225 \times 10^4$  versus  $350 \times 10^4$ ).



**Figura 6. Avaliação da viabilidade da *L. braziliensis* em cultura de monócitos de pacientes com LD infectados com o parasito.** Monócitos do sangue periférico de pacientes com LD (n=8) foram infectados com *L. braziliensis* em uma proporção de 5:1, após 2 horas as culturas foram lavadas para a retirada das promastigotas que não infectaram as células, em seguida o meio de cultura de células foi substituído por meio Schneider e as células foram mantidas em cultura por mais 2, 24, 48, e 72 horas. O número de promastigotas viáveis foi obtido através contagem de parasitos móveis nos sobrenadantes das culturas. Os resultados estão representados em mediana e amplitude interquartil. O método estatístico utilizado para as comparações foi o de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ .

Em seguida decidimos comparar os parasitos viáveis nas culturas de monócitos de pacientes com LD e LC infectados com *L. braziliensis*. Ao compararmos o número de promastigotas viáveis nos sobrenadantes de cultura de monócitos infectados com o parasito observamos que existem mais promastigotas de *L. braziliensis* viáveis em culturas de monócitos de pacientes com LD após 72 horas (35 [29-49]) quando comparados com os LC (22 [12-30]) embora não seja estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ) (**Figura 7**). Esse dado suporta a idéia de que os monócitos de pacientes com LD de alguma forma permitem a maior proliferação do parasito, assim como a sua disseminação. Esses dados também sugerem que os monócitos que previamente pareciam se infectar menos, ou que conseguiam controlar a infecção, estão menos infectados porque provavelmente após 72 horas de infecção e intensa proliferação a *Leishmania* rompeu as células e foram liberadas para o meio extracelular.

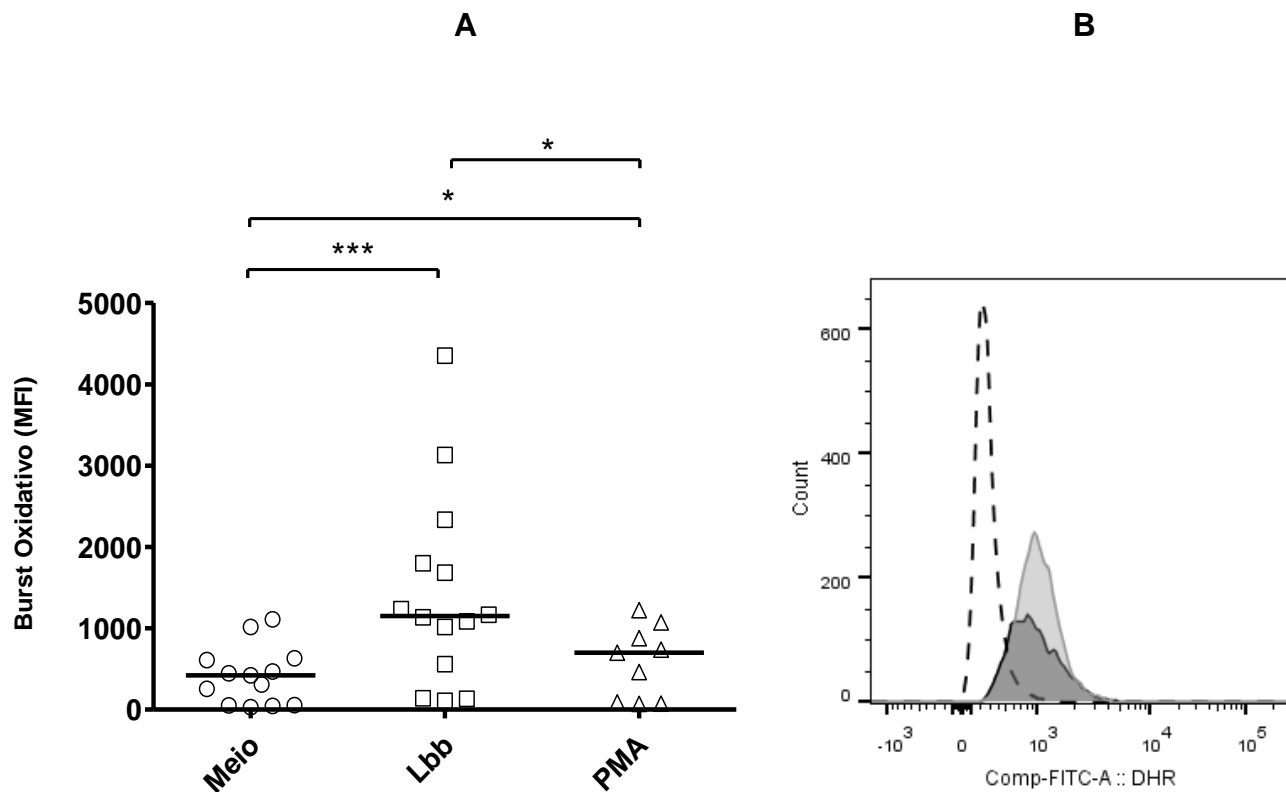


**Figura 7. Avaliação da viabilidade da *L. braziliensis* em cultura monócitos de pacientes com LD infectados com o parasito.** Gráfico representativo da análise da viabilidade das promastigotas de *L. braziliensis* em sobrenadantes de culturas de monócitos de pacientes com LD (n=8) e LC (n=9). Monócitos do sangue periférico foram infectados com *L. braziliensis* em uma proporção de 5:1 e após 2 horas as culturas foram lavadas para a retirada das promastigotas que não infectaram as células. Em seguida o meio de cultura de células foi substituído por meio Schneider e as células foram mantidas em cultura por 72 horas. O número de promastigotas viáveis foi obtido através contagem de parasitos móveis nos sobrenadantes das culturas. Os resultados estão representados em mediana e amplitude interquartil. Os grupos foram comparados pelo teste estatístico de Mann-Whitney (\* p= 0,05).

#### VI. 4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO BURST OXIDATIVO EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LD POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para avaliar a atividade microbicida dessas células, foi avaliada a expressão do burst oxidativo. Os monócitos de pacientes com LD foram sensibilizados com Dihydrorhodamine 123 e posteriormente desafiados com *L. braziliensis* para a determinação de espécies reativas por citometria de fluxo utilizando a média de intensidade de fluorescência (MFI). Como estratégia de análise os monócitos foram marcados com anticorpos contra os grupamentos de diferenciação anti-CD14 e anti-CD16 para que fosse possível selecionar somente os monócitos clássicos (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>) para a análise. A estratégia utilizada encontra-se em Material e Métodos, **página 47, Figura 2**. Durante todos os experimentos de avaliação do burst oxidativo utilizou-se também um controle negativo, sem estímulos, e um controle positivo com PMA+Ionomicina para verificar a produção das espécies reativas na ausência do estímulo específico **(Figura 8)**.

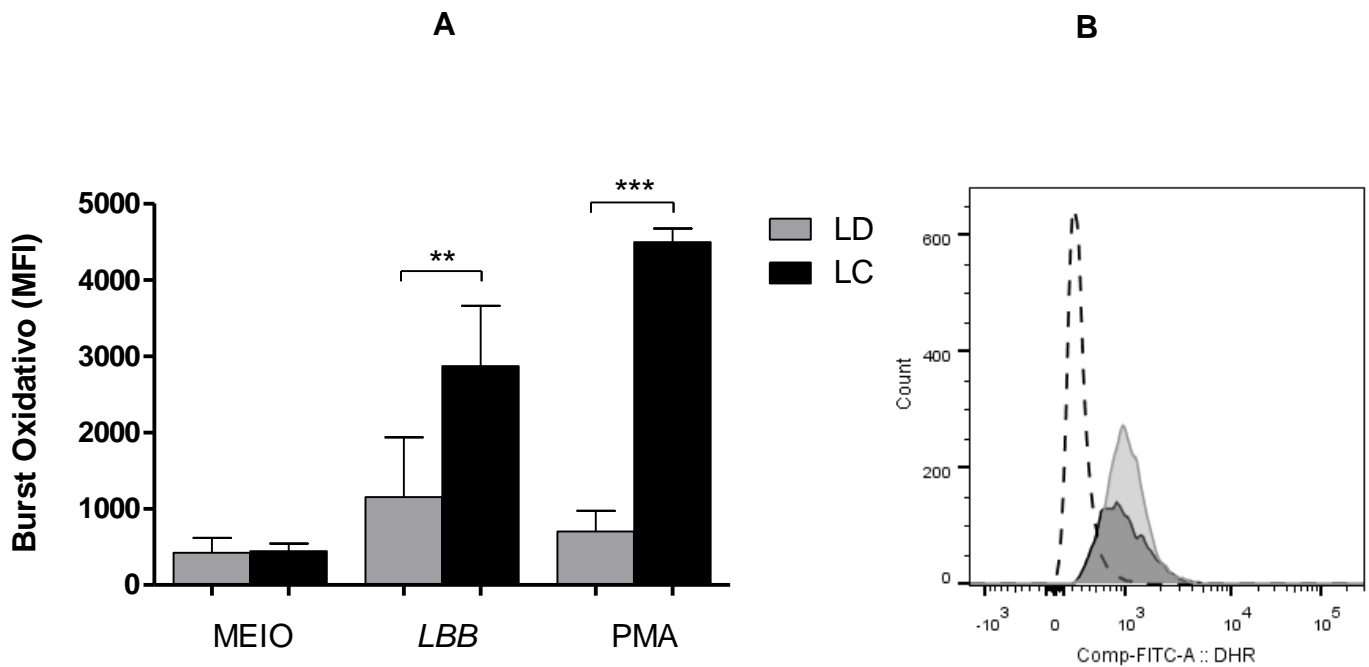




**Figura 8. Avaliação da expressão do Burst Oxidativo em monócitos de pacientes com LD por citometria de fluxo.** Monócitos do sangue periférico de pacientes com LD (n=14) foram tratados com DHR-123 e em seguida infectados com *L. braziliensis*. Os monócitos também foram marcados com anticorpos anti-CD14 e anti-CD16 e as análises foram realizadas por citometria de fluxo. A Figura A representa a expressão do burst oxidativo em monócitos de pacientes com LD após infecção com *L. braziliensis*, PMA e meio. A Figura B representa os histogramas das análises por citometria de fluxo. O histograma com linha tracejada representa o burst oxidativo sem estímulo, apenas meio; o histograma com linha contínua na cor preta representa o burst oxidativo após o estímulo com *L. braziliensis*; enquanto que a linha contínua em cinza representa o burst oxidativo após o estímulo com o PMA. Os resultados estão expressos em MFI do burst oxidativo produzido. Todos os valores estão representados em mediana e amplitude interquartil. A expressão do burst oxidativo em diferentes condições de cultura foi comparada pelo teste de Wilcoxon (\*\* $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,05$ ).

Ao serem desafiados com a *L. braziliensis* os monócitos clássicos rapidamente começam a expressar moléculas formadoras do burst oxidativo **(Figura 8)**. O aumento da produção de espécies reativas pôde ser observado dentro de alguns minutos após o primeiro encontro entre os monócitos e a *Leishmania* em relação ao MEIO (sem estímulo) (MFI 422 [53-620] *versus* 1152 [454-1934],  $p < 0,001$ ). Esse aumento da produção de espécies reativas em decorrência do contato com a *Leishmania* é maior inclusive do que quando se estimulou as células com o mitógeno PMA (MFI 1152 [454-1934] *versus* 700 [81-975], \*  $p < 0,05$ ).

Posteriormente, nós comparamos a produção do burst oxidativo por monócitos de pacientes com LD com monócitos de pacientes com LC. **(Figura 9)**.



**Figura 9. Expressão do burst oxidativo em monócitos de pacientes com LD e LC após a infecção com *L.braziliensis* por citometria de fluxo.** Monócitos de sangue periférico de pacientes com LD (n=13) e LC (n=11) foram marcados com anti-CD14, anti CD16 e DHR. As células foram estimuladas com *L. braziliensis* ou com PMA. A Figura A representa a expressão do burst oxidativo em pacientes com LD e LC em diferentes condições de cultura. Os histogramas representativos das análises por citometria estão demonstrados na Figura B. O histograma com linha tracejada representa o burst oxidativo sem estímulo, apenas meio; o histograma com linha contínua na cor preta representa o burst oxidativo após o estímulo com *L. braziliensis*; enquanto que a linha contínua em cinza representa o burst oxidativo após o estímulo com o PMA. Os resultados estão expressos em MFI do burst oxidativo produzido. Todos os valores estão representados em mediana e amplitude interquartil e os valores de P foram obtidos através do teste estatístico de Mann-Whitney (\*\* $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

A análise da produção espontânea de espécies reativas não mostrou diferença entre os grupos de pacientes com LD e LC. Entretanto, após a infecção com *L.braziliensis*, os monócitos de pacientes com LD produzem uma menor quantidade de burst oxidativo (MFI 1152 [454-1934]) quando comparado com as células dos pacientes com LC (MFI 2867 [1752-3662]),  $p < 0,01$ .

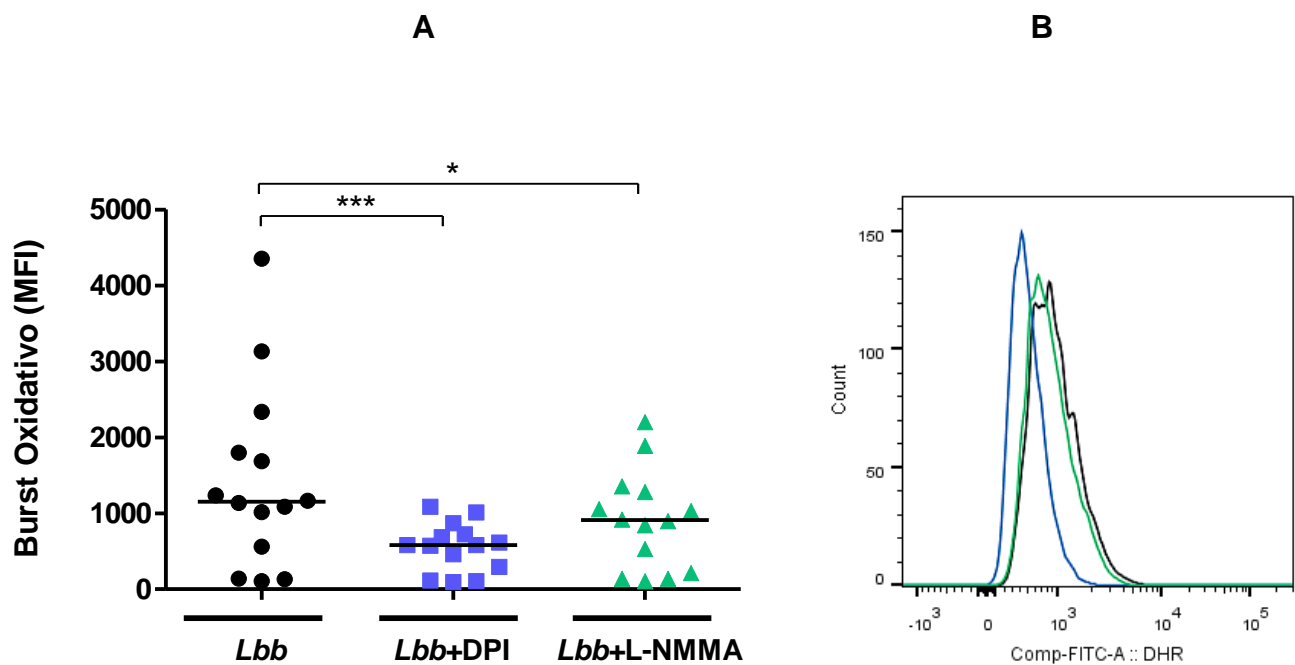
Estes achados sugerem que o aumento da viabilidade das promastigotas de *L. braziliensis* pode estar relacionado a uma baixa produção do burst oxidativo.

#### VI. 5. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO BURST OXIDATIVO APÓS INIBIÇÃO DA ENZIMA NADPH OXIDASE E NOS SINTETASE EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LD APÓS A INFECÇÃO COM *L. braziliensis*

Para distinguir se a produção do burst oxidativo está relacionada à produção de ROS ou do NO após a opsonização dos parasitos, os experimentos foram realizados na presença de inibidores de via do NO e da via de ROS.

Foi avaliada a expressão do burst oxidativo após a inibição da NADPH-oxidase (enzima responsável pela produção das espécies reativas do oxigênio), e da óxido nítrico sintetase (enzima responsável pela produção do NO) através do uso dos inibidores DPI e L-NMMA, respectivamente.

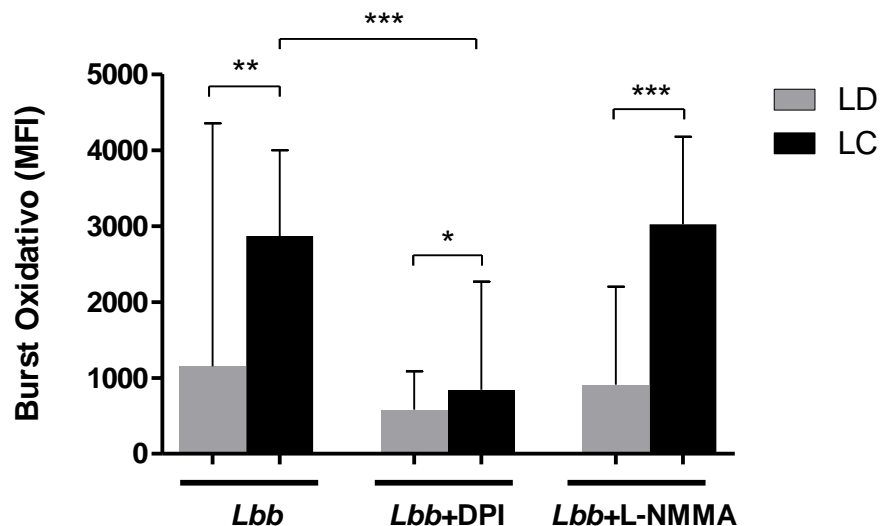
Os monócitos do sangue periférico foram inicialmente tratados com DPI ou L-NMMA, em seguida as células foram infectadas e após a marcação com anticorpos anti-CD14 e anti-CD16 avaliou-se a expressão do burst oxidativo **(Figura 10)**.



**Figura 10. Expressão do burst oxidativo após inibição da enzima NADPH oxidase e NOS sintetase em monócitos de pacientes com LD após a infecção com *L. braziliensis*.** Monócitos de pacientes com LD (n=14) foram sensibilizados com DHR-123, posteriormente foram adicionados os inibidores da NADPH oxidase (DPI) e da NOS sintetase (L-NMMA) às culturas. Estas células foram então infectadas com *L. braziliensis* e os monócitos marcados com anticorpos anti-CD14 e anti-CD16 e os dados analisados por citometria de fluxo. A Figura A representa a expressão do burst oxidativo após a inibição de importantes vias do burst oxidativo. Os histogramas representativos das análises por citometria estão demonstrados na Figura B A linha preta representa o burst oxidativo após o estímulo com *L. braziliensis*; a linha em azul representa a produção do burst oxidativo após o estímulo com *L. braziliensis* e o tratamento com DPI; enquanto que a linha em verde ilustra a produção do burst oxidativo após estímulo com *L. braziliensis* e tratamento com L-NMMA. Os resultados estão expressos em MFI do burst oxidativo produzido. Todos os valores estão representados em mediana e amplitude interquartil. Os grupos foram comparados utilizando o teste estatístico de Wilcoxon (\*\* $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,05$ ).

A inibição das duas vias diminuiu significativamente a produção do burst oxidativo, mas uma inibição mais acentuada foi observada quando a via de ROS foi inibida (MFI 1152 [454-1934] *versus* 581 [248-760]),  $p < 0,001$  (**Figura 10**).

Posteriormente, comparamos a produção do burst oxidativo após a inibição das vias de ROS e do NO entre os grupos LD e LC (**Figura 11**).



**Figura 11. Expressão do burst oxidativo após inibição da enzima NADPH oxidase e NOS Sintetase em monócitos de pacientes com LD e LC após a infecção com *L. braziliensis*.** Monócitos de pacientes com LD (n=14) e LC (n=16) foram sensibilizados com DHR-123, posteriormente foram adicionados os inibidores da NADPH oxidase (DPI) e da NOS sintetase às culturas. Estas células foram então infectadas com *L. braziliensis* e os monócitos marcados com anticorpos anti-CD14 e anti-CD16 e os dados analisados por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos em MFI do burst oxidativo. As barras em cinza representam os pacientes com LD, enquanto que as barras cheias em preto representam os pacientes com LC. Todos os valores estão representados em mediana e amplitude interquartil. Os valores de P foram obtidos através do teste de Mann-Whitney (\*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ ).

Na LC a inibição da via de ROS interferiu significativamente com a produção do burst oxidativo (MFI 2867 [1752-3662] *versus* 845 [597-1952],  $p < 0,001$ ) enquanto a inibição da via do NO não alterou essa produção (MFI 2867 [1752-3662] *versus* 3022 [2174-3532],  $p = 0,9$ ), sugerindo que a produção do burst oxidativo reflete mais a produção de ROS do que a produção de NO (**Figura 11**).

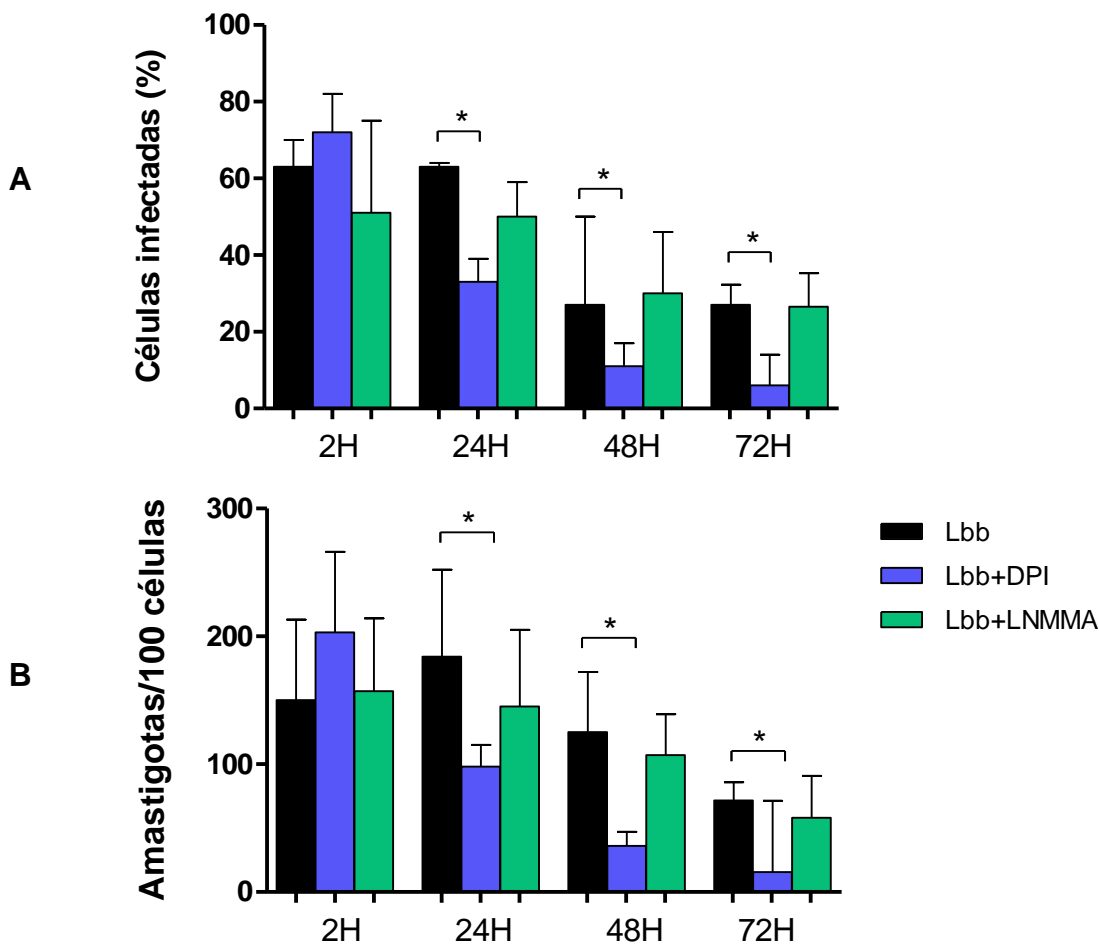
Entretanto, a inibição da via dos ROS ou NO diminuiu mais significativamente a produção do burst oxidativo por monócitos de pacientes com LD (MFI 581 [248-760] e 909 [197-1300], respectivamente) quando comparado com a produção por monócitos de LC (MFI 845 [597-1952] e 3022 [2174-3532], respectivamente),  $p < 0,05$ .

Esses resultados sugerem que nos pacientes com LD as 2 vias estão envolvidas na produção do burst oxidativo, com uma participação maior dos ROS.

#### VI. 6. AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE INFECÇÃO E DA CARGA PARASITÁRIA DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM LD INFECTADOS COM *L. braziliensis* APÓS A INIBIÇÃO DAS ENZIMAS NADPH OXIDASE E NOS SINTETASE

Para avaliar a contribuição que as espécies reativas produzidas por monócitos durante o burst oxidativo possuem no controle da infecção por *L. braziliensis*, realizou-se a inibição de moléculas-chave nas vias da formação dos ROS (NADPH oxidase) e do NO (NOS sintetase). Após a inibição dessas vias os monócitos foram infectados com *L. braziliensis*. O número de células infectadas e de carga parasitária foi estimado por microscopia óptica após a realização da técnica de Cytospin (**Figura 12**).

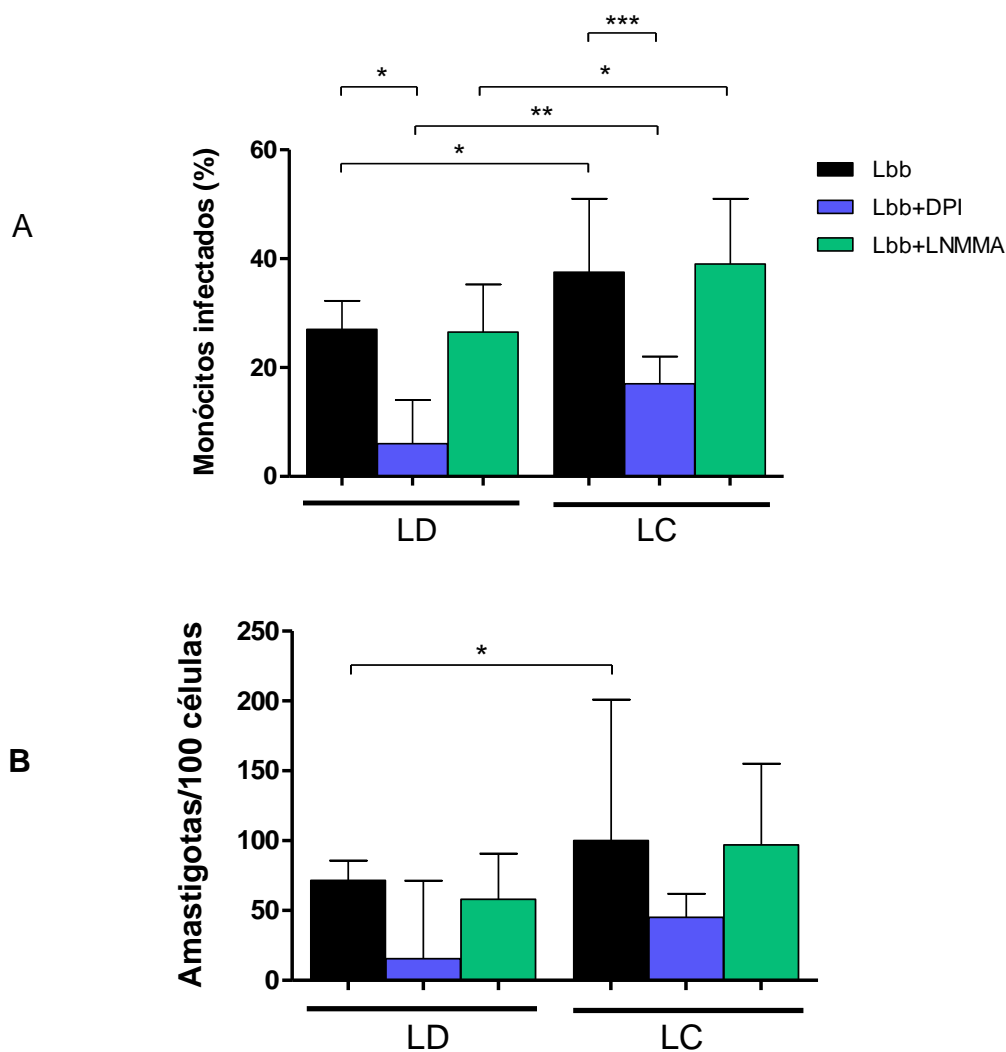




**Figura 12. Avaliação do percentual de infecção e da carga parasitária de monócitos de pacientes com LD infectados com *L. braziliensis* após a inibição das enzimas NADPH oxidase e NOS sintetase.** Monócitos do sangue periférico de pacientes com LD (n=8) foram tratados com DPI para a inibição da produção dos ROS e L-NMMA para a inibição da produção de NO. As células foram infectadas por 2, 24, 48 e 72 horas para estimarmos o percentual de células infectadas (Figura A) e a carga parasitária (Figura B). Todos os valores estão representados em mediana e amplitude interquartil. Os grupos foram comparados utilizando o teste estatístico de Mann-Whitney (\*  $p < 0,05$ )

Após a inibição da produção de ROS observou-se que o número de monócitos de pacientes com LD infectados e de carga parasitária diminuiu significativamente desde as primeiras 24 horas de infecção (63% [46-64] *versus* 33% [32-39] e 184 [99-252] *versus* 98 [84-115], respectivamente) (**Figura 12**). Por outro lado, a inibição da produção das espécies reativas do nitrogênio não alterou esses números. Provavelmente, a inibição da produção dos ROS que são moléculas importantes no controle da infecção deve se relacionar com um ambiente ainda mais favorável para a replicação parasitária que permitiu a proliferação e rompimento das membranas celulares. Contudo, a inibição da produção de NO em monócitos desses pacientes não produziu quaisquer alterações em relação ao percentual de células infectadas e a carga parasitária em todos os tempos observados.

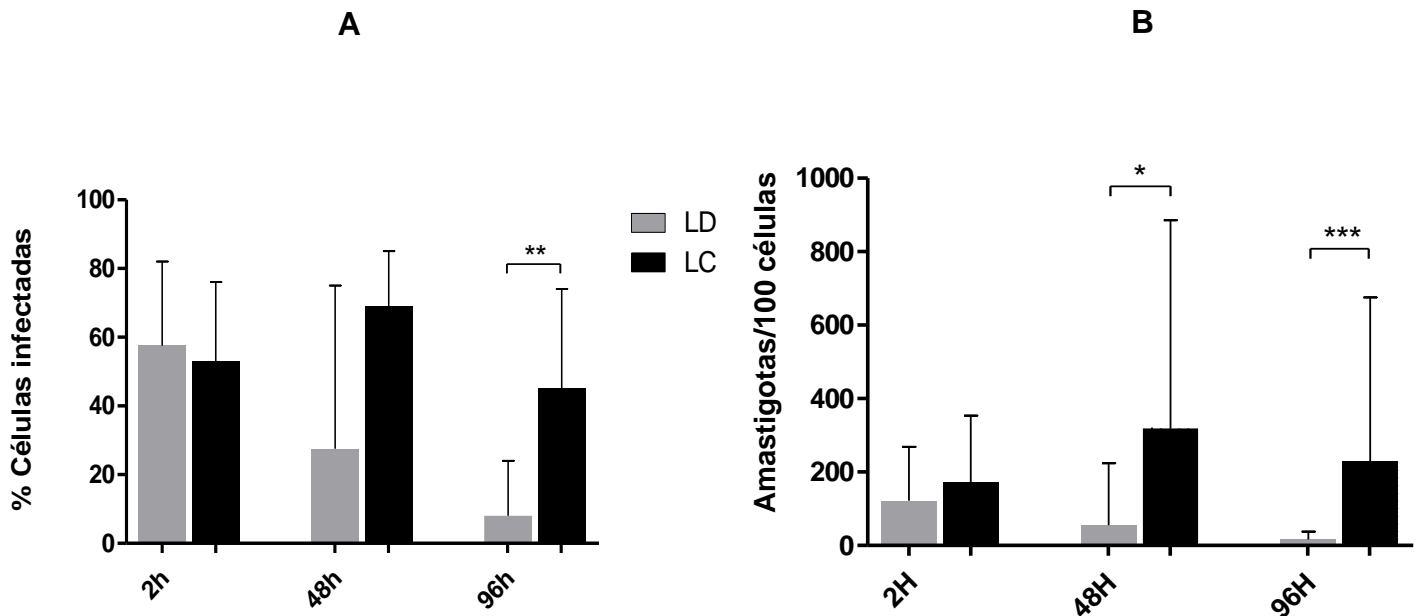
Ao comparar os grupos de pacientes com LD e LC foi observado que os monócitos de pacientes com LD estão com menor percentual de infecção após 72 horas de cultura tanto após a inibição da produção de ROS (6% [0,5-14] *versus* 17% [13-22], \*\*  $p < 0,01$ ) quanto após a inibição da formação de NO (26% [13-35] *versus* 39% [37-51], \*  $p < 0,05$ ) quando comparados com LC (**Figura 13**). A carga parasitária, por sua vez, foi a mesma nos dois grupos quando as enzimas NADPH oxidase e NO sintetase foram inibidas (**Figura 13**).



**Figura 13. Avaliação do percentual de infecção e da carga parasitária de monócitos de pacientes com LD e LC infectados com *L. braziliensis* após a inibição das enzimas NADPH oxidase e NOS sintetase.** Monócitos do sangue periférico de pacientes com LD (n=8) e LC (n=16) foram tratados com DPI para a inibição da produção de ROS e L-NMMA para a inibição da produção de NO. As células foram infectadas por mais 72 horas para estimarmos o percentual de células infectadas (Figura A) e a carga parasitária (Figura B). Todos os valores estão representados em mediana e amplitude interquartil. Os grupos foram comparados utilizando os testes estatísticos de Mann-Whitney e Wilcoxon (\*\* $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ).

## VI. 7. AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS MACRÓFAGOS NA PATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE DISSEMINADA

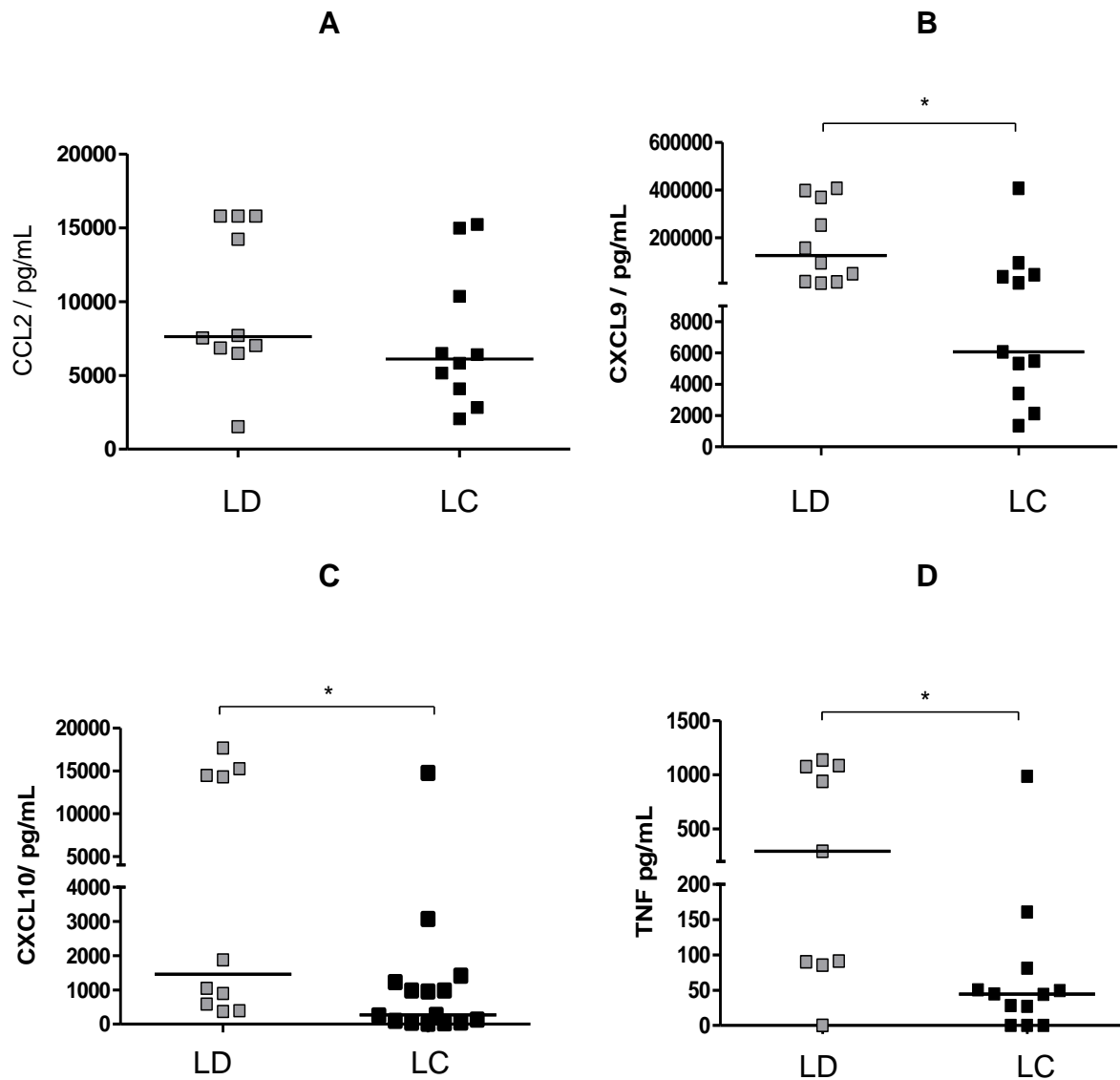
Giudice, et al (2012), demonstraram que macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico de pacientes com LC e LM não controlavam a infecção e produziam mais moléculas inflamatórias quando comparado com macrófagos de indivíduos sub-clínicos e controles sadios (GIUDICE et al., 2012). Dessa forma, nós avaliamos também o papel dos macrófagos na patogênese da leishmaniose disseminada. Os macrófagos foram infectados por diversos períodos de tempo e o número de células infectadas e a carga parasitária estão apresentados nas **Figuras 14, A e B**.



**Figura 14. Avaliação da infecção e da carga parasitária em macrófagos de pacientes com LD e LC após a infecção por *L.braziliensis*.** Monócitos do sangue periférico de pacientes com LD (n=7) e LC (n=11) foram isolados e posteriormente submetidos a 6 dias de cultura em placas Lab-Tek Chamber Slide para a sua diferenciação em macrófagos. Em seguida, os macrófagos foram infectados com *L. braziliensis* e submetidos a mais 2, 48 e 96 horas de cultura. A Figura A representa o número de células infectadas e a Figura B a carga parasitária. Todos os valores estão representados em mediana e amplitude interquartil. As comparações entre os grupos foram feitas com o teste estatístico de Mann-Whitney (\*\* $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ).

Os macrófagos comportaram-se de maneira semelhante aos monócitos em relação às taxas de infecção. Após 96 horas de cultura, o número de macrófagos infectados foi menor em pacientes com LD (7% [2-9]) quando comparado com os macrófagos de pacientes com LC (42% [24-60]),  $p < 0,01$  (**Figura 14.A**). O mesmo foi observado em relação à carga parasitária. Os macrófagos de pacientes com LD apresentaram um menor número de amastigotas (15 [5-18]) quando comparado com pacientes com LC (205 [59-407]),  $p < 0,001$  (**Figura 14.B**).

Foi avaliada também a produção de moléculas inflamatórias (CCL2, CXCL9, CXCL10 e TNF) pelos macrófagos após a infecção com *L.braziliensis* (**Figura 15**).



**Figura 15. Avaliação da produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos de pacientes com LD e LC após a infecção por *L.braziliensis*.** Monócitos do sangue periférico de pacientes com LD e LC foram isolados e posteriormente submetidos à 6 dias de cultura em placas Lab-Tek Chamber Slide para a sua diferenciação em macrófagos. Em seguida, os macrófagos foram infectados com *L. braziliensis* e submetidos a mais 2, 48 e 96 horas de cultura. A avaliação da produção de CCL2 (A), CXCL9 (B), CXCL10 (C) e de TNF (D) foi realizada através da técnica de ELISA após 96 horas de cultura. Todos os valores estão representados em mediana e amplitude interquartil. As comparações entre os grupos foram feitas com o teste estatístico de Mann-Whitney (\*  $p < 0,05$ ).

Nossos dados mostraram que não existe diferença na produção da quimiocina CCL2, produzida por macrófagos, entre pacientes com LD e LC após 96 horas de cultura (**Figura 15.A**). Contudo, os macrófagos de pacientes com LD produziram mais TNF (293 pg/mL [87-1079] *versus* 44 pg/mL [6-73],  $p < 0,05$ ), CXCL9 (125.494 pg/mL [15.887-376.642] *versus* 6071 pg/mL [3414-44.681],  $p < 0,05$ ) e CXCL10 (1460 pg/mL [537-14.675] *versus* 273 pg/mL [43-1230],  $*p < 0,05$ ) quando comparado com a produção dessas moléculas por macrófagos de pacientes com LC (**Figura 15**).

Esses resultados sugerem que a produção dessas moléculas parece não estar relacionado com o controle da infecção já que na LD se observa a disseminação da doença.

#### VI. 8. CORRELAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) E NÚMERO DE LESÕES EM PACIENTES COM LD

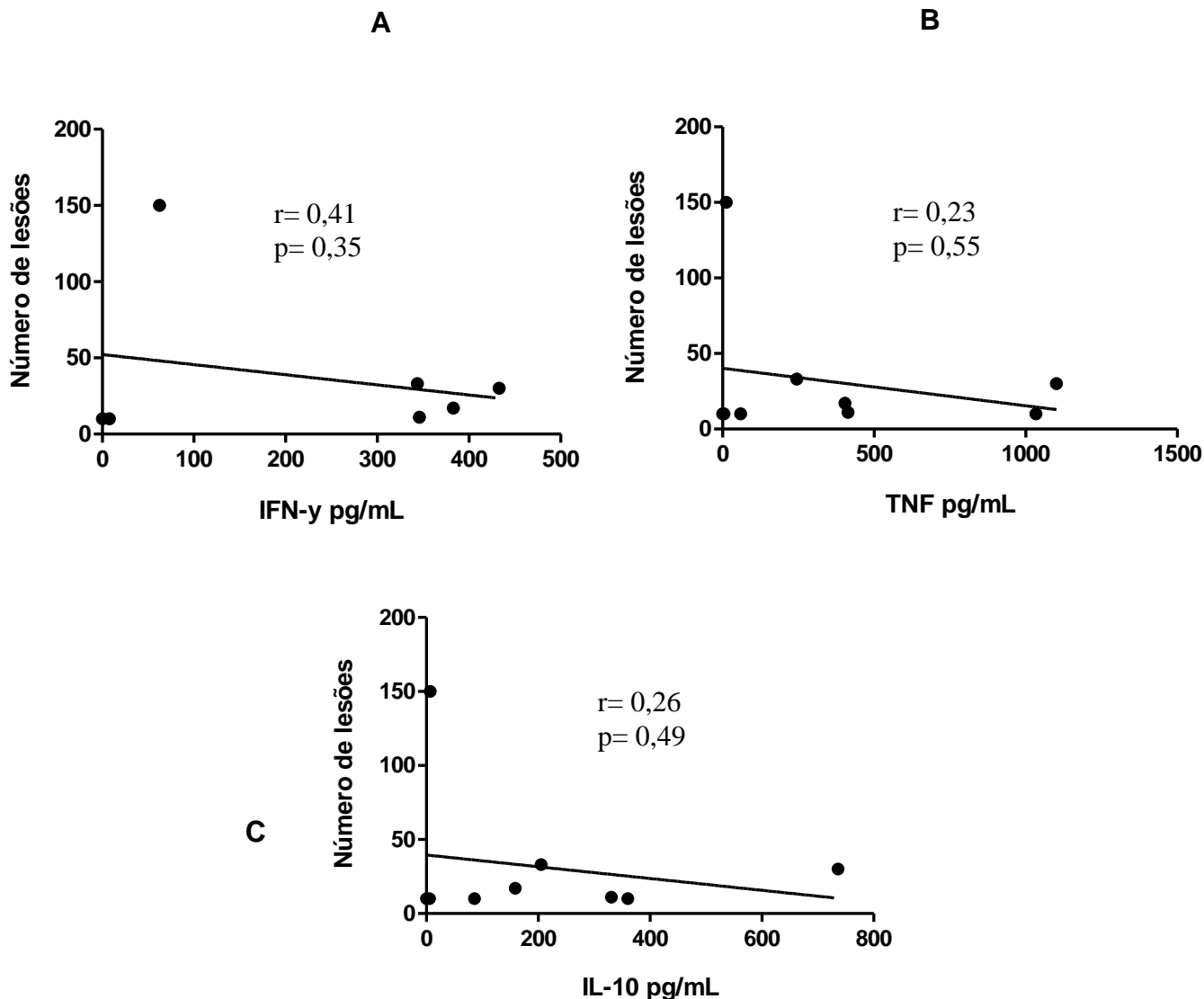
Neste estudo, os pacientes com LD apresentaram baixa produção das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF produzidas por PBMCs quando comparado com pacientes com LC (344 pg/mL [61-475] *versus* 1180 pg/mL [572-3126] e 112 pg/mL [11-413] *versus* 1700 pg/mL [456-2845], respectivamente). Por outro lado, a citocina regulatória IL-10 foi encontrada em concentrações semelhantes ao que se observa na LC (**Tabela 1**).

Para avaliar se a produção de algumas citocinas tanto do perfil Th1, quanto



Th2 produzidas por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com LD se relacionam com o número de lesões apresentado, realizamos uma análise de correlação entre essas variáveis **(Figura 16)**.

Não foi possível observar correlação entre a produção das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF por PBMCs de pacientes com LD e o número de lesões observado nesses pacientes ( $r= 0,41$ ;  $p= 0,35$  e  $r= 0,23$ ;  $p= 0,55$ ) **(Figura 16.A e 16.B)**. De forma semelhante, também não encontramos associação entre a produção de IL-10 e o número de lesões apresentado ( $r= 0,26$ ;  $p=0,49$ ) **(Figura 16.C)**.

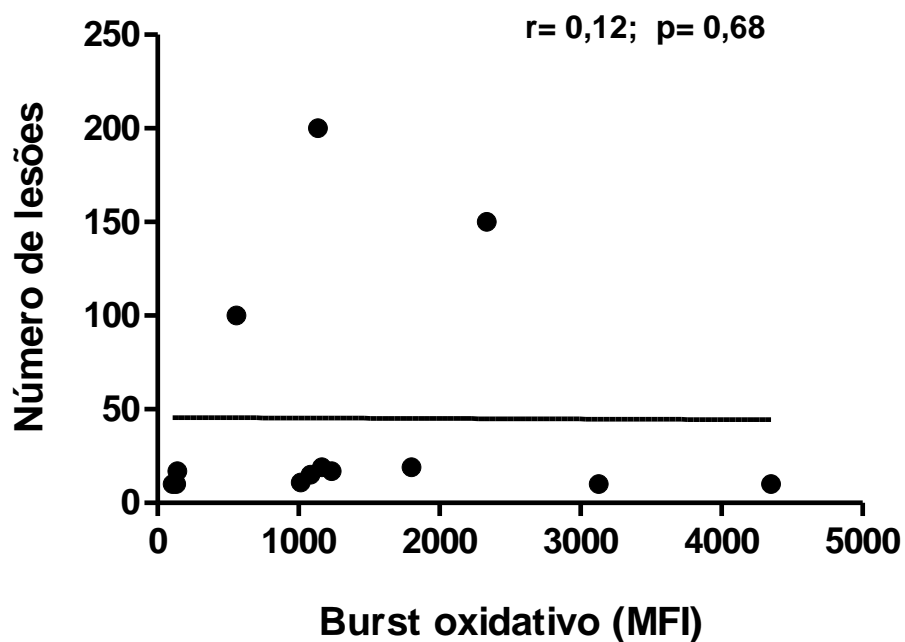


**Figura 16. Correlação entre a produção de citocinas produzidas por PBMCs e o número de lesões de pacientes com leishmaniose disseminada.** Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) e submetidas a 72 horas de cultura para a dosagem de citocinas por ELISA. A Figura A representa a produção de IFN- $\gamma$ , enquanto que as Figuras B e C ilustram a produção de TNF e IL-10, respectivamente. Os valores do número de lesões foram obtidos pela contagem das lesões totais nos pacientes

com LD. O valor de “r” representa o coeficiente de correlação de Spearman.

#### VI. 9. CORRELAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DO BURST OXIDATIVO E O NÚMERO DE LESÕES EM PACIENTES COM LD

Alguns estudos já propuseram no passado a existência de uma associação entre a produção de espécies reativas e o processo inflamatório em algumas doenças (VANE et al., 1994; LAROUX et al., 2001; COLEMAN, 2001). Em relação à leishmaniose tegumentar, também tem sido demonstrado que existe associação entre a produção da enzima iNOS e o número de lesões observado (QADOUMI et al, 2002). Para avaliar se o aumento da produção do burst oxidativo estava associada com o número de lesões foi feita uma análise de correlação (**Figura 17**). Contudo, não foi encontrada nenhuma correlação entre a produção do burst oxidativo e o número de lesões nos pacientes com LD ( $r= 0,12$ ;  $p= 0,68$ ).



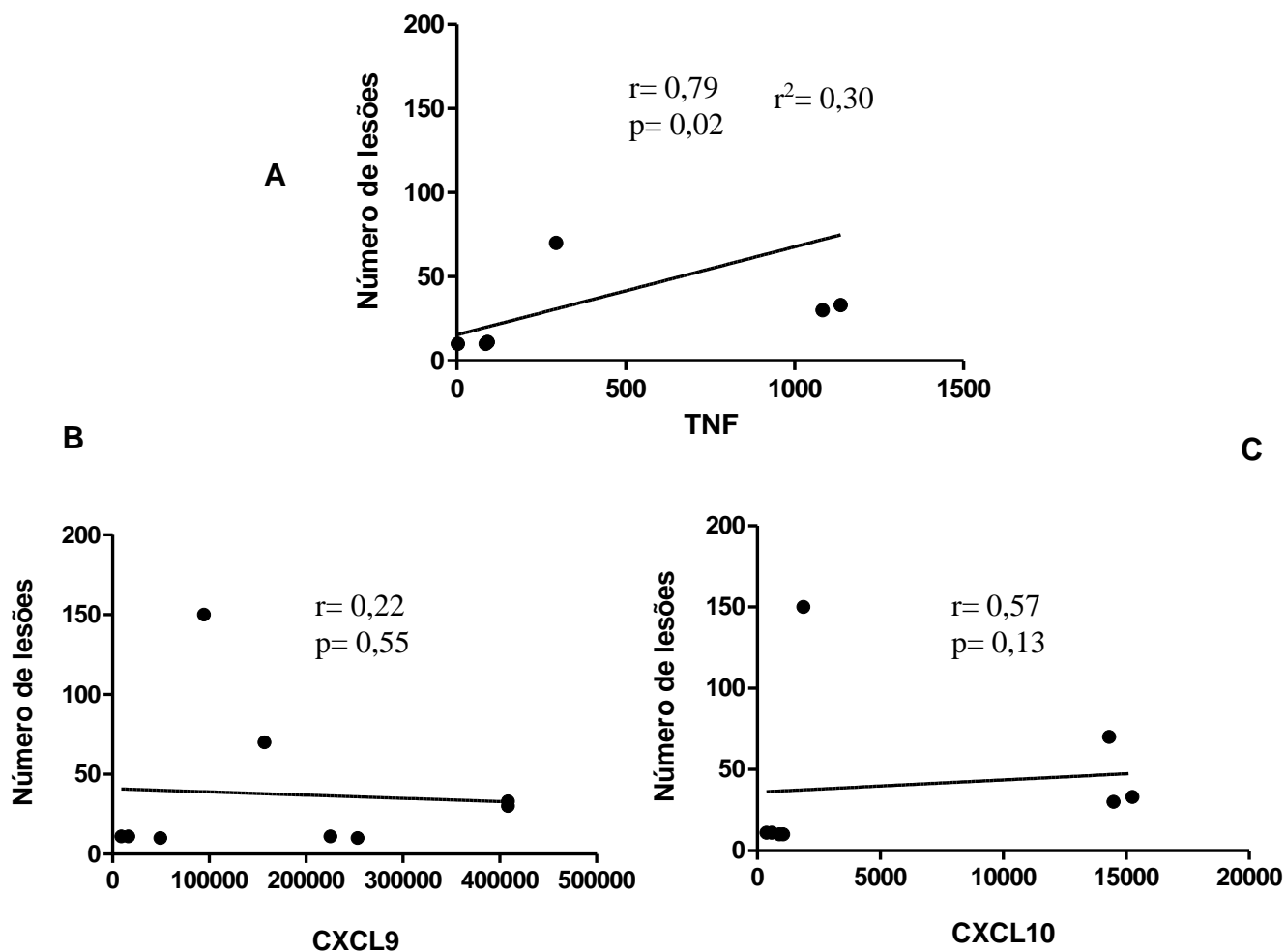
**Figura 17. Correlação entre a produção do burst oxidativo e o número de lesões de pacientes com leishmaniose disseminada.** A produção do burst oxidativo foi avaliada através da marcação com DHR-123 em monócitos infectados com *L.braziliensis* por citometria de fluxo. Os valores do número de lesões foram obtidos pela contagem das lesões totais nos pacientes com LD. O valor de “r” representa o coeficiente de correlação de Spearman.

## VI. 10. CORRELAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS DE PACIENTES COM LD INFECTADOS COM *L. braziliensis* E NÚMERO DE LESÕES

Como visto previamente, nossos resultados mostraram que os macrófagos de pacientes com LD produzem mais TNF, CXCL9 e CXCL10 quando comparados com os pacientes com LC. Com o intuito de avaliar se a elevada produção dessas citocinas poderiam estar associadas com a presença de mais lesões nos pacientes com LD, realizamos uma análise de correlação entre a produção dessas citocinas e o número total de lesões nesses pacientes.

A citocina TNF, importante no recrutamento e ativação do estado microbicida de neutrófilos e fagócitos mononucleares, esteve fortemente correlacionada com o número de lesões observado nos pacientes com LD ( $r= 0,79$ ;  $p= 0,02$ ) (**Figura 18.A**). Ao analisarmos o modelo de regressão linear simples, encontramos um  $r^2= 0,30$ , que significa que 30% do número de lesões encontrado nesses pacientes pode ser explicado pela elevada produção da citocina TNF pelos macrófagos. Esses resultados sugerem que os macrófagos podem participar da patogênese da LD produzindo elevadas concentrações de TNF.

Por outro lado, apesar das elevadas concentrações, não foram encontradas nenhuma associação entre a produção das quimiocinas CXCL9 e CXCL10 e o número de lesões nos pacientes com LD ( $r= 0,22$ ;  $p= 0,5$  e  $r= 0,57$ ;  $p= 0,13$ , respectivamente) (**Figura 18**).



**Figura 18. Correlação entre a produção de citocinas produzidas por macrófagos de pacientes com LD infectados com *L. braziliensis* e o número de lesões observado.** Macrófagos de pacientes com LD foram infectados com *L. braziliensis* e submetidas a 48 horas de cultura para a dosagem de citocinas por ELISA. A Figura A representa a correlação entre a citocina TNF e o número de lesões, enquanto que as Figuras B e C ilustram as correlações feitas entre CXCL9 e CXCL10 e o número de lesões nos pacientes com LD. Os valores do número de lesões foram obtidos pela contagem das lesões totais nos pacientes com LD. O valor de  $r$  representa o coeficiente de correlação de Spearman e  $r^2$  representa o coeficiente de determinação obtido através da regressão linear simples.

## VII. DISCUSSÃO

A patogênese da LTA causada por *L.braziliensis* está fortemente associada com uma forte resposta inflamatória onde é observada uma grande produção de IFN- $\gamma$  e TNF e ausência de IL-10, uma citocina reguladora da resposta imune (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998; BACELLAR et al., 2002; ANTONELLI et al., 2005). Em contraste, na LCD, a ausência completa de uma resposta celular do tipo Th1 permite a multiplicação do parasito e a disseminação da doença (BOMFIM et al., 1996). Entretanto, na LD, onde é observada a presença de centenas de lesões, a produção de citocinas inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF é menor quando comparada com pacientes com LC e LM (TURETZ et al., 2002; MACHADO et al., 2011). Os resultados encontrados nesse estudo mais uma vez confirmam que a produção dessas citocinas é menor em pacientes com LD quando comparado com os pacientes com LC. Embora essa produção seja menor, por si só isso não explicaria o aparecimento de múltiplas lesões nesses pacientes.

Os macrófagos são as principais células que abrigam a *Leishmania* e conseqüentemente a sobrevivência ou a morte desse parasita depende da ativação dessas células. Existem poucos estudos demonstrando o papel da resposta imune inata no controle da infecção por *L. braziliensis*. Nesse estudo nós avaliamos o papel dos monócitos/macrófagos de pacientes com LD na patogênese da doença.

Inicialmente nós comparamos a susceptibilidade de monócitos de pacientes com LD e LC frente à infecção com *L. braziliensis*. Foi observada uma diminuição

no percentual e na carga parasitária nos monócitos de pacientes com LD após 72 horas de infecção quando comparado com o período de 2 horas. No período de duas horas não houve diferença nesses índices entre os grupos LD e LC, sugerindo que a leishmania penetra igualmente nas células dos pacientes com LC e LD. Um estudo realizado por Giudice et al. (2012), já havia demonstrado que não existia diferença na infecção de macrófagos e na carga parasitária de pacientes com LC, LM, indivíduos SC e controles sadios após 2 horas de infecção, indicando que não existia diferença na penetração da leishmania nos macrófagos nesses grupos (GIUDICE et al., 2012). Entretanto, um estudo realizado por Bosque et al. (2000), demonstrou que macrófagos de pacientes com LC recorrente são mais permissivos à infecção com *L.panamensis* quando comparado com indivíduos assintomáticos e controles sadios.

No presente estudo, após 72 horas de cultura esses índices (percentual de infecção e carga parasitária) em monócitos de pacientes com LD foram menores quando comparados com os observados em monócitos de pacientes com LC. Giudice et al. (2012) já haviam também demonstrado que após 96 horas o número de macrófagos infectados e a carga parasitária foram maiores em pacientes com LC e LM, quando comparado com indivíduos SC e controles sadios. De alguma forma, nossos resultados foram um pouco inesperados desde quando esses dados podem indicar que os monócitos de pacientes com LD têm uma capacidade maior de controlar a infecção. Para comprovar essa observação, foi realizado o ensaio de viabilidade da *Leishmania*, para avaliar se a diminuição do número de células infectadas e da carga parasitária estava associada com o controle da infecção pelos monócitos. O que foi observado é que existia um aumento no



número de promastigotas móveis no sobrenadante de cultura de monócitos infectados de pacientes com LD após 72 horas de cultura quando comparados com 2 horas de infecção. Embora sem significado estatístico, a comparação entre os dois grupos de pacientes mostrou que o número de parasitas viáveis em 72 horas de cultura foi maior no grupo LD. Uma explicação possível para esses achados é que monócitos de pacientes com LD permitem a proliferação do parasito, e após 48-72 horas de infecção há um rompimento das células, liberando a *Leishmania* para o meio extracelular.

Nesse estudo nós avaliamos também a produção do burst oxidativo por monócitos de pacientes com LD após a infecção com *L.braziliensis*. Nossos dados mostraram que a infecção com leishmania foi capaz de induzir a produção do burst oxidativo pelos monócitos de pacientes com LD. Entretanto, essa produção foi menor quando comparada com a produção observada em monócitos de pacientes com LC. Esses dados sugerem que o aumento na viabilidade das promastigotas de *L.braziliensis* pode estar relacionado com uma produção diminuída do burst oxidativo por monócitos de pacientes com LD. Uma explicação possível para a diminuição do burst oxidativo em monócitos de pacientes com LD é que possivelmente essas células estejam expressando menos receptores de reconhecimento para o parasito. Alguns dados da literatura apontam para a ação dos receptores Toll-like como fortes indutores da resposta oxidativa na infecção por *Leishmania*. O contato do LPG com o Toll Like receptor 4 (TLR4) estimula a síntese da NADPH oxidase e o aumento da produção de ROS (SASADA et al., 1983; GILL et al., 2010). Srivastava et al. (2013) demonstraram que a expressão de Toll Like receptor 2 (TLR2) aumentada nos macrófagos de camundongos

infectados por *L.major* estava associada com uma maior resposta oxidativa, em especial pelo reconhecimento da LPG pelo TLR 2, com a ativação de MyD88 e o aumento da expressão da iNOS (SRIVASTAVA et al., 2013). Mais recentemente, um estudo realizado com pacientes com leishmaniose visceral mostrou que a diminuição do burst oxidativo em monócitos desses pacientes estava associada a uma diminuição de expressão de TLR4 nessas células (ROY et al., 2014). Como os pacientes com LD produzem menos IFN- $\gamma$  que os pacientes com LC e como a produção de oxidantes pelos monócitos é dependente da ativação dessas células por citocinas, principalmente o IFN- $\gamma$  (MURRAY et al., 2000; NOVAIS et al., 2014), é possível que a quantidade menor dessa citocina esteja associada à diminuição do burst oxidativo nos pacientes com LD.

Os mecanismos utilizados pelos macrófagos humanos para matar a leishmania ainda não são totalmente estabelecidos (FANG et al., 2007; SCHNEEMANN et al., 2007). Enquanto que em camundongos tem sido observado um papel importante da produção de óxido nítrico no processo de morte da *Leishmania* (STENGER et al., 1994; ASSREUY et al., 1994; EVANS et al., 1993; MURRAY et al., 1992).

Para avaliar se a produção do burst oxidativo estava associada à produção do NO ou de ROS, foram realizados experimentos na presença de inibidores das duas vias. A inibição da via do NO e dos ROS diminuiu a produção do burst oxidativo com uma diminuição mais acentuada após a inibição da NADPH-oxidase. Esses dados sugerem que os ROS estejam sendo mais produzidos durante o burst oxidativo em relação à produção do NO por monócitos de

pacientes com LD após a infecção com *L.braziliensis*. Ao compararmos a participação dessas moléculas na produção do burst oxidativo em células de pacientes com LC foi observado que nesses pacientes a produção do burst oxidativo reflete a produção de ROS e não do NO. Estes resultados corroboram com o estudo realizado por Chang *et al.*, (2007), que observaram que a produção do burst oxidativo em monócitos humanos após a infecção por *L. chagasi*, permaneceu inalterada, após a inibição da iNOS, sugerindo que o burst oxidativo refletia mais a produção de ROS. Gantt *et al.* (2001) mostrou que houve diferença na sobrevivência da *L. chagasi*, em macrófagos murinos, quando foi adicionado o inibidor da iNOS (L-NMMA) com um aumento da carga parasitária após 48 horas de infecção, sugerindo que o NO é importante no controle da infecção em células de murinos. Entretanto, o mesmo não foi observado em monócitos humanos, demonstrando que nestas células o NO parece não participar no controle da infecção por *L. chagasi*.

Em nosso estudo, a inibição da produção de ROS em monócitos de pacientes com LD diminuiu o número de células infectadas e a carga parasitária enquanto a inibição do NO não alterou esses números. Esses dados sugerem que os ROS são importantes no controle da infecção e o que provavelmente aconteceu foi uma forte replicação parasitária que permitiu o rompimento das células e liberação dos parasitos para o meio extracelular. Alguns dados da literatura já mostraram que a produção de ROS está relacionada com o controle da infecção por patógenos intracelulares. Em modelo animal de infecção por *Trypanosoma cruzi*, a elevada produção de ROS por macrófagos infectados estava associada à diminuição da carga parasitária (GUPTA *et al.*, 2011). Todavia,

mais recentemente foi demonstrado que animais deficientes da NADPH oxidase infectados com *T. cruzi* tinham uma menor sobrevivência embora eles apresentassem a mesma carga parasitária do que os animais selvagens. Essa observação foi associada com o aumento nos níveis séricos de nitrito e nitrato, sugerindo que ambos os oxidantes são importantes no controle da infecção por *T. cruzi* (SANTIAGO *et al.*, 2012). Na infecção de macrófagos humanos com *Toxoplasma gondii* foi documentado que a elevada produção de ROS teve um papel importante na eliminação dos parasitos (SHRESTHA *et al.*, 2006). Na leishmaniose experimental causada por *Leishmania amazonensis* foi documentada a participação de ROS como substância leishmanicida (DEGROSSOLI *et al.*, 2011; FONSECA-SILVA, 2013). Mais recentemente, Novais *et al.* (2014) demonstraram que *L. braziliensis* induziu a produção de ROS por monócitos humanos e que a produção dessa molécula levou ao controle da infecção.

Os macrófagos além de albergarem a leishmania, eles secretam moléculas que estimulam a resposta inflamatória, como citocinas e quimiocinas. O papel das quimiocinas na infecção por *Leishmania*, além do recrutamento dos leucócitos, inclui participação na imunidade mediada por células, ativação celular e atividade leishmanicida (TEIXEIRA *et al.*, 2006). A produção de diferentes padrões de quimiocinas associadas às várias formas clínicas da leishmaniose tegumentar sugere uma importante participação dessas moléculas na resposta imune protetora à *Leishmania*.

Nesse estudo nós avaliamos a produção de CCL2, uma quimiocina responsável pelo recrutamento de monócitos, macrófagos, células NK, células importantes na resposta imune contra a leishmania (RITTER, MOLL, 2000).

Alguns estudos *in vitro* têm demonstrado a capacidade de CCL2 de induzir atividade leishmanicida em macrófagos e induzir burst oxidativo em monócitos humanos (ROLLINS et al., 1991; MOLL et al., 1997). Essa quimiocina também sinergiza com o IFN- $\gamma$  para ativar macrófagos para matar a leishmania (RITTER, MOLL, 2000). Em pacientes com LC causada por *Leishmania mexicana*, onde as lesões são auto-curáveis, é observada altas concentrações dessa quimiocina. Em contraste, baixas concentrações de CCL2 são observadas em leishmaniose cutânea difusa (RITTER et al., 1996). Mais recentemente, um estudo mostrou que a expressão gênica de CCL2 em macrófagos humanos infectados com cepas de *L.panamensis* isolada de pacientes com leishmaniose crônica e cepas isoladas de pacientes com lesões auto curáveis, foi maior em células infectadas com cepas de pacientes com doença crônica (NAVAS et al., 2014). Nesse estudo, os macrófagos de pacientes com LD infectados com *L.braziliensis* produziram CCL2, mas essa produção não foi diferente da observada em macrófagos de pacientes com LC. Macrófagos de pacientes com LC e LM produzem mais essa quimiocina quando comparado com indivíduos SC e controles sadios, sugerindo que essa molécula pode participar da patogênese da leishmaniose tegumentar causada por *L.braziliensis* (GIUDICE et al., 2012).

A produção de CXCL9 e CXCL10 por macrófagos de pacientes com LD após a infecção com *L.braziliensis* também foi avaliada. Macrófagos infectados de pacientes com LD produziram grande quantidade de CXCL9 e CXCL10 e essa produção foi maior quando comparado com a produção pelas células de pacientes com LC. CXCL9 e CXCL10, quimiocinas induzidas e indutoras de IFN- $\gamma$

respectivamente, são importantes na imunidade inata e na imunidade adaptativa contra a infecção por *Leishmania* e possuem a capacidade de atrair células T para o sítio da infecção. No infiltrado celular nas lesões dos pacientes com LD são encontrados linfócitos TCD8<sup>+</sup> e TCD4<sup>+</sup>, além de macrófagos e células B, mas que é semelhante ao observado nas lesões de pacientes com LC. (VIEIRA et al., 2002; DANTAS et al., 2014). Um estudo realizado em lesões de pacientes com LD e LC demonstrou não haver diferença na expressão dessas quimiocinas entre os grupos. Entretanto, a produção de CXCL9 foi maior no plasma de pacientes com LD quando comparado com pacientes com LC (MACHADO et al., 2011). Esses achados contrastam com a menor produção de IFN- $\gamma$  e de TNF por células mononucleares do sangue periférico estimulados com antígeno solúvel de leishmania desses mesmos pacientes. Entretanto, essa observação poderia indicar que células T específicas para o parasito poderiam estar sendo recrutadas para o sítio da infecção e estarem participando da patogênese da doença. Um estudo realizado com macrófagos de pacientes com LC e LM mostrou que essas células após a infecção com *L.braziliensis* produziam mais CXCL9 quando comparado com células de indivíduos sub clínicos e controles sadios (GIUDICE et al., 2012). CXCL9 e CXCL10 têm sido reportadas como tendo um papel importante na patogênese de outras doenças inflamatórias e auto-imunes como a infecção pelo HTLV-1 (GUERREIRO et al., 2006), esclerose múltipla (MAHAD et al., 2007) e hepatite C (WALD et al., 2007). Os resultados do presente estudo sugerem que células da resposta imune inata e moléculas produzidas por essas células podem ter um papel importante na patogênese da doença.

O TNF é uma citocina inflamatória que tem um papel importante na resposta imune contra a *Leishmania*. Entretanto, na leishmaniose tegumentar causada por *L.braziliensis* essa citocina está associada com a patologia (ANTONELLI et al., 2005; DA-CRUZ et al., 1996; BÁFICA et al., 2003; MACHADO et al., 2007). Nesse estudo nós mostramos que macrófagos de pacientes com LD após a infecção por *L.braziliensis* produzem TNF e essa produção é maior quando comparado com a produção observada em macrófagos de pacientes com LC. Essa observação difere do encontrado em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimulados com antígeno solúvel de leishmania desses mesmos pacientes, onde a produção desta citocina é menor que a observada em pacientes com LC (TURETZ et al., 2002; MACHADO et al., 2011).

Para avaliar se as produções dessas moléculas poderiam estar associadas à aspectos clínicos da LD, algumas análises de correlação foram realizadas. Interessantemente, foi encontrada uma forte correlação entre a produção de TNF por macrófagos e o número de lesões em pacientes com LD. Esse resultado reforça a idéia que moléculas produzidas durante a resposta imune inata estejam associadas à patogênese da leishmaniose disseminada.

Embora os mecanismos responsáveis pela disseminação da doença ainda não estejam completamente elucidados, os resultados desse estudo contribuem para o conhecimento do papel da resposta imune inata na patogênese da leishmaniose disseminada causada por *L.braziliensis*.

## **VIII. SUMÁRIO DE RESULTADOS**

1. Nossos dados mostram que as PBMCs de pacientes com leishmaniose disseminada produzem menores concentrações das citocinas Th1, IFN- $\gamma$  e TNF, quando desafiadas com *L. braziliensis in vitro* em relação aos pacientes com leishmaniose cutânea. Contudo, não existe diferença na produção da citocina IL-10 quando comparados os pacientes com LD e LC.

2. No presente estudo foi observado que os monócitos/macrófagos de pacientes com leishmaniose disseminada se encontram menos infectados e com menor carga parasitária do que os monócitos/macrófagos de pacientes leishmaniose cutânea nos últimos períodos de infecção. Esse resultado inesperado pode estar relacionado com o maior número de promastigotas de *L. braziliensis* viáveis que pudemos observar nos sobrenadantes de células de pacientes com LD em relação aos LC.

3. Os monócitos de pacientes com leishmaniose disseminada apresentam uma menor produção do burst oxidativo quando comparado com os pacientes com LC. Além disso, a inibição das vias da produção dos ROS e NO sugerem que os ROS estão mais relacionados com a formação do burst oxidativo do que o NO.

4. A produção das citocinas CXCL9 e CXCL10 por macrófagos é maior nos



**pacientes com LD quando comparados com os pacientes com LC. Ademais, os macrófagos de pacientes com LD produzem mais TNF do que os macrófagos de pacientes com LC e esta citocina, por sua vez, está fortemente correlacionada com o número de lesões nos pacientes com LD.**

## **XI. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Os resultados obtidos através desse estudo permitiram caracterizar o comportamento que monócitos/macrófagos de pacientes com leishmaniose disseminada apresentam após serem desafiados com a *L. braziliensis*.

Com o objetivo de investigar quais mecanismos estariam relacionados com o não controle da proliferação do parasito investigaremos a participação dos receptores de reconhecimento padrão presentes nos monócitos/macrófagos de pacientes com LD, como os toll like receptors, para entender os mecanismos que tornariam estas células mais susceptíveis à infecção.

Pretendemos melhor avaliar o papel do burst oxidativo na patogênese da LD avaliando também a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) que é responsável pela geração dos intermediários reativos de maior poder microbicida.

Avaliar o papel da citocina TNF através da sua inibição em culturas de macrófagos e avaliação das taxas de infecção dessas células em decorrência do bloqueio.

## **X. CONCLUSÕES**

**A proliferação da *L. braziliensis* está provavelmente associada com a baixa produção do burst oxidativo pelos pacientes com leishmaniose disseminada.**

**A elevada produção de moléculas pro-inflamatórias por macrófagos pode contribuir para a patogênese da doença.**

## XI. SUMMARY

### **EVALUATION OF THE ROLE OF MONOCYTES/MACROPHAGES IN THE PATHOGENESIS OF DISSEMINATED LEISHMANIASIS CAUSED BY *L. braziliensis***

**Background:** Disseminated leishmaniasis (DL) is an emerging form of *Leishmania braziliensis* infection characterized by multiple cutaneous lesions on different parts of the body. The mechanism that allows parasite dissemination in DL is unknown. Monocytes/macrophages play an important role in the innate immune response and the early control of *Leishmania* parasites has been associated with macrophages activation and parasite killing. However, some studies have shown that macrophages also may participate in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis (CL). The hypothesis of this study is that DL patients are more susceptible to *L. braziliensis* leading to disease dissemination and produce higher amounts of inflammatory molecules as compared to monocytes/macrophages of LC patients. **The aim of this study** was to characterize the function of monocytes/macrophages from DL upon infection with *L. braziliensis*. **Methods:** Peripheral blood monocytes and monocyte-derived macrophages of DL and CL patients were infected with *L. braziliensis* in a ratio of 5:1 in different periods of time. The number of infected monocytes and parasite load was determined by optical microscopy. Promastigotes viability was assessed by counting of extracellular motile promastigotes after 3 days of culture in Schneider medium. Determination of oxidative burst was performed by oxidation of Dihydrorhodamine 123 and assessed by flow cytometry. Cytokine/chemokines production was measured by enzymatic immunoassay (ELISA). **Results:** Monocytes from DL patients had a lower proportion of infected cells and parasite burden as compared to CL patients at the last time of infection. However, the number of viable parasites at 72 hours, in supernates of culture of monocytes was higher in DL patients. The production of oxidative burst by monocytes from DL patients after infection with *L. braziliensis* was lower as compared to CL monocytes. The production TNF, CXCL9 and CXCL10 cytokines were higher in cultures of macrophages from DL patients as compared to CL patients. A strong correlation was observed between TNF production by macrophages and the number of lesions in patients with DL. **Conclusion:** The proliferation of *L. braziliensis* in patients with disseminated cutaneous leishmaniasis is likely associated with low production of oxidative burst and the higher production of inflammatory molecules by macrophages may contribute to pathogenesis of the disease.

**KEYWORDS:** Disseminated leishmaniasis, *Leishmania braziliensis*, macrophages, monocytes, chemokines.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alexander, J.; Vickerman, K. Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *The Journal of protozoology*, 22(4):502-8, 1975.
2. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7(5): e35671, 2012.
3. Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunology letters*, 101(2): 226-30, 2005.
4. Arce A, Estirado A, Ordobas M, Sevilla S, García N, Moratilla L, de la Fuente S, Martínez AM, Pérez AM, Aránguez E, Iriso A, Sevillano O, Bernal J, Vilas F. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro surveillance*, 18(30): 20546, 2013.
5. Assreuy J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'Donnell CA, Liew FY, Moncada S. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *European journal of immunology*, 24(3):672-6, 1994.
6. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *The Journal of clinical investigation*, 52(3):741-4, 1973.
7. Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG.. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 272(1):217-21, 1997.
8. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO,

- Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and immunity*, 70(12): 6734-6740, 2002.
9. Báfica A, Oliveira F, Freitas LA, Nascimento EG, Barral A. American cutaneous leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline. *International journal of dermatology*, 42(3): 203-207, 2003.
  10. Ben Salah A, Louzir H, Chlif S, Mokni M, Zaatour A, Raouene M, Ismail RB, Dellagi K., A., et al. The predictive validity of naturally acquired delayed-type hypersensitivity to leishmanin in resistance to *Leishmania major*-associated cutaneous leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*, 192(11): 1981-87, 2005.
  11. Bittencourt, A. L.; Barral, A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86(1): 51-56, 1991.
  12. Blos M, Schleicher U, Soares Rocha FJ, Meissner U, Röllinghoff M, Bogdan C.. Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania major* infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. *European journal of immunology*, 33(5):1224-34, 2003.
  13. Bray RS. Leishmaniasis. In: Immunological investigation of tropical parasitic diseases, edit. PorHouba, V. London: Churchill Livingtone, 65-74, 1980.
  14. Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A.. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Experimental parasitology*, 84(2): 188-194, 1996.
  15. Bosque F, Saravia NG, Valderrama L, Milon G.. Distinct innate and acquired immune responses to *Leishmania* in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to *L. (Viannia) panamensis* infection. *Scandinavian journal of immunology*, 51(5): 533-541, 2000.
  16. Buchmüller, Y.; Mael, J. Studies on the mechanisms of macrophage activation:

possible involvement of oxygen metabolites in killing of *Leishmania enrietti* by activated mouse macrophages. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, 29(3):181-92, 1981.

17. Cadenas, E.; Sies, H. Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. *Advances in enzyme regulation*, 23:217-37, 1985.

18. Chang, K.P.; Dwyer, D.M. Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. *Science*, 193(4254):678-80, 1976.

19. Chang, K.P.; Dwyer, D.M. *Leishmania donovani*. Hamster macrophage interactions in vitro: cell entry, intracellular survival, and multiplication of amastigotes. *The Journal of experimental medicine*. 147(2):515-30, 1978.

20. Chang K.P. Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 30(2):322-33, 1981.

21. Chang HK, Thalhofer C, Duerkop BA, Mehling JS, Verma S, Gollob KJ, Almeida R, Wilson ME. Oxidant generation by single infected monocytes after short-term fluorescence labeling of a protozoan parasite. *Infection and immunity*, 75(2):1017-24, 2007.

22. Channon, J.Y.; Roberts, M.B.; Blackwell, J.M. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. *Immunology*, 53(2):345-55, 1984.

23. Childs, G.E.; Lightner, L.K.; McKinney, L.; Groves, M.G.; Price, E.E.; Hendricks, L.D. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiops*. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 78: 25-34, 1984.

24. Carvalho EM, Badaró R, Reed SG, Jones TC, Johnson WD Jr. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *The Journal of clinical investigation*, 76(6): 2066-2069, 1985.

25. Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta*

*tropica*,56(4): 315-325, 1994.

26. Carvalho EM, Correia Filho D, Bacellar O, Almeida RP, Lessa H, Rocha H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 53(3):273-7, 1995.
27. Coleman, J.W. Nitric oxide in immunity and inflammation. *International immunopharmacology*, 1(8):1397-406, 2001.
28. Costa JM, Saldanha AC, de Melo e Silva AC, Serra Neto A, Galvão CE, Pedroso e Silva Cde M, da Silva AR. The current status of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in the state of Maranhão. II. The epidemiological and clinico-evolutionary aspects. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 25(2):115-23, 1992.
29. Cupolillo, E; Grimaldi, G. Jr; Momen H. A general classification of New World Leishmania using numerical zymotaxonomy. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 50(3):296-311, 1994.
30. Da-Cruz AM, de Oliveira MP, De Luca PM, Mendonça SC, Coutinho SG. Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(2):225-9, 1996.
31. Dantas ML, de Oliveira JM, Carvalho L, Passos ST, Queiroz A, Guimarães LH, Machado P, Carvalho E, Arruda S. Comparative analysis of the tissue inflammatory response in human cutaneous and disseminated leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 09(2): 202-209, 2014.
32. Degrossoli A, Arrais-Silva WW, Colhone MC, Gadelha FR, Joazeiro PP, Giorgio S. The influence of low oxygen on macrophage response to Leishmania infection. *Scandinavian journal of immunology*, 74(2):165-75, 2011.
33. Dermine JF, Goyette G, Houde M, Turco SJ, Desjardins M.. Leishmania donovani lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. *Cellular microbiology*, 7(9): 1263-1270, 2005.
34. Evans TG, Thai L, Granger DL, Hibbs JB Jr. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *The Journal of immunology*, 151(2):907-



15, 1993.

35. Fang, F.C.; Nathan, C.F. Man is not a mouse: reply. *Journal of leukocyte biology*, 81(3):580, 2007.
36. Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J Jr, Schriefer A, Machado PR, Lessa H, Carvalho LP, Romano-Silva MA, de Jesus AR, Carvalho EM, Dutra WO. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infection and immunity*, 73(12): 7853-7859, 2005.
37. Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clinical infectious diseases*, 34(11): E54-58, 2002.
38. Fonseca-Silva F, Inacio JD, Canto-Cavalheiro MM, Almeida-Amaral EE.
39. Author information. Reactive oxygen species production by quercetin causes the death of *Leishmania amazonensis* intracellular amastigotes. *Journal of natural products*, 76(8):1505-8, 2013.
40. Franke ED, McGreevy PB, Katz SP, Sacks DL. Growth cycle-dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes. *The Journal of immunology*, 134(4): 2713-2718, 1985.
41. Furchgott, R. F.; Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789):373-6, 1980.
42. Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1984;6 Suppl 2:S336-43.
43. Furchgott, R.F.; Jothianandan, D. Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels*, 28(1-3):52-61, 1991.

44. Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jeronimo SM, Nascimento ET, Britigan BE, Wilson ME. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *The Journal of immunology*, 167(2):893-901, 2001.
45. Galvão CE, Silva AC, Saldanha AC, Silva CM, Costa Mdo R, Costa JM.. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania viannia braziliensis* in the state of Maranhao, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 26(2): 121-123, 1993.
46. Getachew, F.; Gedamu, L. *Leishmania donovani* iron superoxide dismutase A is targeted to the mitochondria by its N-terminal positively charged amino acids. *Molecular and biochemical parasitology*, 154(1):62-9, 2007.
47. Ghosh, S.; Goswami, S.; Adhya, S. Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage. *The Biochemical journal*, 369(Pt 3):447-52, 2003.
48. Gill R, Tsung A, Billiar T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free radical biology & medicine*, 48(9):1121-32, 2010.
49. Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, Pelliccia G, Luzi L, Minucci S, Marcaccio M, Pinton P, Rizzuto R, Bernardi P, Paolucci F, Pelicci PG. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell*, 122(2):221-33, 2005.
50. Giudice, A., et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC infectious diseases*, 12:75, 2012.
51. Guerreiro JB, Santos SB, Morgan DJ, Porto AF, Muniz AL, Ho JL, Teixeira AL Jr, Teixeira MM, Carvalho EM. Levels of serum chemokines discriminate clinical myelopathy associated with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) disease from HTLV-1 carrier state. *Clinical and experimental immunology*, 145(2):296-301, 2006.
52. Guimarães LH, Machado PR, Lago EL, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, Carvalho EM. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a

transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Jul; 103 (7):712-5. 2009.

53. Gupta S, Dhiman M, Wen JJ, Garg NJ. ROS signalling of inflammatory cytokines during *Trypanosoma cruzi* infection. *Advances in parasitology*, 76:153-70, 2011.

54. Gutteridge JM, Quinlan GJ, Wilkins S. Mitomycin C-induced deoxyribose degradation inhibited by superoxide dismutase. A reaction involving iron, hydroxyl and semiquinone radicals. *FEBS letters*. 167(1):37-41, 1984.

55. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *The Biochemical journal*. 219(1):1-14, 1984.

56. Hepburn, N.C. Cutaneous leishmaniasis: current and future management. *Expert review of anti-infective therapy*, 1(4):563-70, 2003.

57. Ischiropoulos, H.; Zhu, L.; Beckman, J.S. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Archives of biochemistry and biophysics*, 298(2):446-51, 1992.

58. Jirmanus L, Glesby MJ, Guimarães LH, Lago E, Rosa ME, Machado PR, Carvalho EM. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, Mar; 86 (3):426-33. 2012.

59. Jones TC, Johnson WD Jr, Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca TF. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *The Journal of infectious diseases*, 156(1): 73-83, 1987.

60. Khouri R, Bafica A, Silva Mda P, Noronha A, Kolb JP, Wietzerbin J, Barral A, Barral-Netto M, Van Weyenbergh J. IFN-beta impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. *The Journal of immunology*, 182(4):2525-31, 2009.

61. Lachaud L, Dedet JP, Marty P, Faraut F, Buffet P, Gangneux JP, Ravel C, Bastien P. Surveillance of leishmaniasis in France, 1999 to 2012. *Euro surveillance*,

18(29): 20534, 2013.

62. Lainson, R.; Ryan, L.; Shaw, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82(3):421-4, 1987.
63. Laroux FS, Pavlick KP, Hines IN, Kawachi S, Harada H, Bharwani S, Hoffman JM, Grisham MB. Role of nitric oxide in inflammation. *Acta physiologica Scandinavica*, 173(1):113-8, 2001.
64. Leopoldo PT, Machado PR, Almeida RP, Schriefer A, Giudice A, de Jesus AR, Ho JL, Guimarães LH, Bacellar O, Carvalho EM. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *BMC infectious diseases*, 6(1): 75, 2006.
65. Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J, Carvalho EM. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 65(2): 87-89, 2001.
66. Lewis, D.H.; Peters, W. The resistance of intracellular *Leishmania* parasites to digestion by lysosomal enzymes. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 71(3):295-312, 1977.
67. Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *The Journal of immunology*, 144(12):4794-7, 1990.
68. Linares E, Giorgio S, Mortara RA, Santos CX, Yamada AT, Augusto O. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. *Free radical biology & medicine*, 30(11):1234-42, 2001.
69. Machado P, Araújo C, Da Silva AT, Almeida RP, D'Oliveira Jr A, Bittencourt A, Carvalho EM. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clinical infectious diseases*, 34(12): E69-73, 2002.
70. Machado PR, Lessa H, Lessa M, Guimarães LH, Bang H, Ho JL, Carvalho EM. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for

mucosal leishmaniasis. *Clinical infectious diseases*, 44(6): 788-793, 2007.

71. Machado PR, Rosa ME, Costa D, Mignac M, Silva JS, Schriefer A, Teixeira MM, Bacellar O, Carvalho EM. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(8): 438-444, 2011.
72. Mahad, D.J.; Howell, S.J.; Woodroffe, M.N. Expression of chemokines in the CSF and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 72(4):498-502, 2002.
73. Mantegazza AR. NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. *Blood*, 112(12):4712-22, 2008.
74. Marsden, P. D. Clinical presentations of *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Parasitol Today*, 1(5): 129-133, 1985.
75. Marsden, P. D., et al. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(6): 859-876, 1986.
76. Matsunaga, K.; Furchgott, R.F. Interactions of light and sodium nitrite in producing relaxation of rabbit aorta. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 248(2):687-95, 1989.
77. Matsunaga, K.; Furchgott, R.F. Responses of rabbit aorta to nitric oxide and superoxide generated by ultraviolet irradiation of solutions containing inorganic nitrite. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 259(3):1140-6, 1991.
78. Mendes DS, Dantas ML, Gomes JM, Santos WL, Silva AQ, Guimarães LH, Machado PR, Carvalho EM, Arruda S. Inflammation in disseminated lesions: an analysis of CD4+, CD20+, CD68+, CD31+ and vW+ cells in non-ulcerated lesions of disseminated leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108 (1) 18-22, 2013.
79. Miao, L.; St Clair, D.K. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free radical biology & medicine*, 47(4):344-56, 2009.

80. Mizrahi A, Berdichevsky Y, Ugolev Y, Molshanski-Mor S, Nakash Y, Dahan I, Alloul N, Gorzalczany Y, Sarfstein R, Hirshberg M, Pick E.. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase complex: chimeric constructs derived from the cytosolic components as tools for exploring structure-function relationships. *J Leukoc Biol.* 2006 May; 79(5):881-95. Review. Erratum in: *Journal of leukocyte biology.* 2006 Aug; 80(2):448-9, 2006.
81. MINISTÉRIO DA SAÚDE. "Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana". Brasília, 2007. p. 17.
82. Ministério da Saúde/SVS. <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/2009>.
83. Moll, H. The role of chemokines and accessory cells in the immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Behring Institute Mitteilungen*, (99): 73-8, 1997.
84. MOREIRA, Juliano. Existe na Bahia o botão de Biskra?: estudo clínico. Anais da Sociedade de Medicina da Bahia, sessão de 30 dez. 1894. *Gazeta Medica da Bahia*, Salvador, v.26, p.254-258. 1895a.
85. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *The Journal of immunology*, 175(1):5-14, 1986.
86. Mosmann, T. R.; R. L. Coffman. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology*, 7: 145-173, 1989.
87. Murray, H.W.; Cartelli, D.M. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. *The Journal of clinical investigation*, 72(1):32-44, 1983.
88. Murray HW, Teitelbaum RF. L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. *The Journal of infectious diseases.* 1992 Mar;165(3):513-7.

89. Murray, H.W.; Delph-Etienne, S. Roles of endogenous gamma interferon and macrophage microbicidal mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Infection and immunity*, 68(1):288-93, 2000.
90. Navas A, Vargas DA, Freudzon M, McMahon-Pratt D, Saravia NG, Gómez MA.. Chronicity of dermal leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis* is associated with parasite-mediated induction of chemokine gene expression. *Infection and immunity*, 82(7):2872-80, 2014.
91. Novais FO, Santiago RC, Báfica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A, de Oliveira CI.. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *The Journal of immunology*, 183(12):8088-98, 2009.
92. Novais FO, Nguyen BT, Beiting DP, Carvalho LP, Glennie ND, Passos S, Carvalho EM, Scott P. Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. *The Journal of infectious diseases*, 209(8):1288-96, 2014.
93. Pinto-da-Silva LH, Camurate M, Costa KA, Oliveira SM, da Cunha-e-Silva NL, Saraiva EM. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complement resistant and highly infective for macrophages in vitro and hamsters in vivo. *International journal for parasitology*, 32(11):1371-7, 2002.
94. Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Röllinghoff M, Bogdan C.. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. *Infection and immunity*, (8):4638-42, 2002.
95. Queiroz A, Sousa R, Heine C, Cardoso M, Guimarães LH, Machado PR, Carvalho EM, Riley LW, Wilson ME, Schriefer A. Association between an emerging disseminated form of leishmaniasis and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* strain polymorphisms. *Journal of clinical microbiology*, 50(12): 4028-4034, 2012.
96. Ritter U, Moll H, Laskay T, Bröcker E, Velazco O, Becker I, Gillitzer R.. Differential

expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*, **173**(3): 699-709, 1996.

97. Ritter, U.; Moll, H. Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of leishmania major by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4. *European journal of immunology*, 30(11):3111-20, 2000.

98. Ritter, U.; H. Korner. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite immunology*, 24(6): 295-301, 2002.

99. Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian journal of medical and biological research*, 31(1): 143-148, 1998.

100. Robledo S, Wozencraft A, Valencia AZ, Saravia N. Human monocyte infection by *Leishmania (Viannia) panamensis*. Role of complement receptors and correlation of susceptibility in vitro with clinical phenotype. *The Journal of immunology*, 152 (3): 1265-1276, 1994.

101. Rogers, M. E.; Chance, M. L.; Bates, P.A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, 124(Pt 5):495-507, 2002.

102. Rollins, B.J.; Walz, A.; Baggiolini, M. Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood*, 78(4):1112-6, 1991.

103. Rot, A.; U. H. von Andrian. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annual review of immunology*, 22: 891-928, 2004.

104. Roy S, Mukhopadhyay D, Mukherjee S, Ghosh S, Kumar S, Sarkar K, Pal D, Bhowmik P, Mandal K, Modak D, Guha SK, Pramanik N, Goswami RP, Saha B, Chatterjee M. A Defective Oxidative Burst and Impaired Antigen Presentation are Hallmarks of Human Visceral Leishmaniasis. *Journal of clinical immunology*, Nov 25, 2014.



105. Ruiz-Ramírez A, Ortiz-Balderas E, Cardozo-Saldaña G, Diaz-Diaz E, El-Hafidi M. Glycine restores glutathione and protects against oxidative stress in vascular tissue from sucrose-fed rats. *Clinical science*, 126(1):19-29, 2014.
106. Sacks, D.; N. Noben-Trauth. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature reviews. Immunology*, 2(11): 845-858, 2002.
107. Santiago HC, Gonzalez Lombana CZ, Macedo JP, Utsch L, Tafuri WL, Campagnole-Santos MJ, Alves RO, Alves-Filho JC, Romanha AJ, Cunha FQ, Teixeira MM, Radi R, Vieira LQ. NADPH phagocyte oxidase knockout mice control *Trypanosoma cruzi* proliferation, but develop circulatory collapse and succumb to infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(2): e1492, 2012.
108. Santos DM, Carneiro MW, de Moura TR, Soto M, Luz NF, Prates DB, Irache JM, Brodskyn C, Barral A, Barral-Netto M, Espuelas S, Borges VM, de Oliveira CI. PLGA nanoparticles loaded with KMP-11 stimulate innate immunity and induce the killing of *Leishmania*. *Nanomedicine*, 9(7):985-95, 2013.
109. Sasada, M.; Pabst, M.J.; Johnston, R.B. Jr. Activation of mouse peritoneal macrophages by lipopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase. *The Journal of biological chemistry*, 258(16):9631-5, 1983.
110. Schriefer A, Schriefer AL, Góes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HA, de Jesus AR, Riley LW, Carvalho EM. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infection and immunity*, 72(1): 508-514, 2004.
111. Schneemann, M.; Schoeden, G. Macrophage biology and immunology: man is not a mouse. *J Leukoc Biol.* 2007 Mar; 81 (3):579; discussion 580. Erratum in: *Journal of leukocyte biology.* 2007 May; 81(5):1334.
112. Schnorr D, Muniz AC, Passos S, Guimaraes LH, Lago EL, Bacellar O, Glesby MJ, Carvalho EM. IFN- $\gamma$  production to leishmania antigen supplements the

- leishmania skin test in identifying exposure to *L. braziliensis* infection. *PLoS Negligence Tropical Disease*, 6(12):e1947. 2012.
113. Schriefer A, Guimarães LH, Machado PR, Lessa M, Lessa HA, Lago E, Ritt G, Góes-Neto A, Schriefer AL, Riley LW, Carvalho EM. Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil. *Emerging infectious diseases*. 15:871–876, 2009.
114. Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A.. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *The Journal of experimental medicine*, 168(5): 1675-1684, 1988.
115. Sies, H.; Cadenas, E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 311(1152):617-31, 1985.
116. Sies, H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klinische Wochenschrift*, 69(21-23):965-8, 1991.
117. Sies, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine*, 91(3C):31S-38S, 1991.
118. Shrestha SP, Tomita T, Weiss LM, Orlofsky A. Proliferation of *Toxoplasma gondii* in inflammatory macrophages in vivo is associated with diminished oxygen radical production in the host cell. *International journal for parasitology*, 36(4):433-41, 2006.
119. Späth GF, Garraway LA, Turco SJ, Beverley SM. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania* major infections in mammalian hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (16):9536-41, 2003.
120. Srivastava S, Pandey SP, Jha MK, Chandel HS, Saha B. *Leishmania* expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. *Clinical and experimental immunology*, 172(3):403-9, 2013.

122. Stenger S, Thüring H, Röllinghoff M, Bogdan C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *The Journal of experimental medicine*, 180(3):783-93, 1994.
123. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*. 270(5234):296-9, 1995.
124. Taylor, A. P.; H. W. Murray. Intracellular antimicrobial activity in the absence of interferon-gamma: effect of interleukin-12 in experimental visceral leishmaniasis in interferon-gamma gene-disrupted mice. *The Journal of experimental medicine*, 185(7): 1231-1239, 1997.
125. Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Barral-Netto M, Barral A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends in parasitology*, 22(1): 32-40, 2006.
126. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Jr, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *The Journal of infectious diseases*, 186(12): 1829-1834, 2002.
127. Ueno, N; Wilson E. M. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends in parasitology*, 28(8): 335-344, 2012.
128. Van Assche T, Deschacht M, da Luz RA, Maes L, Cos P. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free radical biology & medicine*; 51(2):337-51, 2011.
129. Vane, J.R.; Mitchell, J.A.; Appleton, I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby DA. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(6):2046-50, 1994.
130. Vieira MG, Oliveira F, Arruda S, Bittencourt AL, Barbosa AA Jr, Barral-Netto M, Barral A. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7): 979-983, 2002.

131. Vieira-Gonçalves R, Pirmez C, Jorge ME, Souza WJ, Oliveira MP, Rutowitsch MS, Da-Cruz AM. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. *International journal of dermatology*, 47(9): 926-932, 2008.
132. Xia, Y.; Zweier, J.L. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (13):6954-8, 1997.
133. Zingarelli B, O'Connor M, Wong H, Salzman AL, Szabó C. Peroxynitrite-mediated DNA strand breakage activates poly-adenosine diphosphate ribosyl synthetase and causes cellular energy depletion in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *The Journal of immunology*, 156(1):350-8, 1996.
134. Wald O, Weiss ID, Galun E, Peled A. Chemokines in hepatitis C virus infection: pathogenesis, prognosis and therapeutics. *Cytokine*, 39(1):50-62, 2007.
135. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of the leishmaniases. Report of a WHO Expert Committee." World Health Organ Tech Rep Ser **793**: 1-158, 1990.
136. Yeligar SM, Harris FL, Hart CM, Brown LA. Glutathione attenuates ethanol-induced alveolar macrophage oxidative stress and dysfunction by downregulating NADPH oxidases. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 306(5):L429-41, 2014.

### **XIII. ANEXOS**

#### **Anexo I**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.**

**Nome do Projeto:** Avaliação do papel de monócitos/macrófagos na patogênese da leishmaniose disseminada causada por *L. braziliensis*.

**Investigador Principal:** Maria Olivia Amado Ramos Bacellar, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-**Brasil**.

**Comitê de Ética:** Complexo Hospital Universitário Professor Edgard Santos Rua Augusto Viana, s/n - 1º andar, Canela CEP: 40.110-060 Salvador – Bahia- Tel: (71) 3283-8140

**NOME DO PACIENTE:**

---

#### **Número de Identificação no Projeto:**

#### **Convite e Objetivo:**

Você é convidado (a) a participar de um estudo que tem como objetivo entender porque as pessoas têm leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa ou se mantêm infectadas com a *Leishmania* sem apresentar doença. Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo você será solicitado (a) assinar este formulário de consentimento.

**Participação voluntária:** A sua participação é voluntária. Você pode decidir não participar do estudo em qualquer momento, sem perder os benefícios dos cuidados médicos prestados e de seu tratamento caso você tenha a doença cutânea ou mucosa. Caso depois de aceitar participar, resolva descontinuar sua participação, isto será feito sem qualquer prejuízo para você. Participando ou não do estudo você receberá o medicamento utilizado para o tratamento da leishmaniose (Glucantime®) se estiver doente.

**Finalidade do estudo:** Este estudo vai estudar como o seu corpo se defende quando atacado pela *leishmania*. Para isto estudaremos o seu sangue, o parasito que causa a doença quando este for isolado, e caso esteja doente, também o material da ferida obtida pela retirada de um pequeno pedaço da sua pele.

**Procedimentos:** Caso você concorde em participar do estudo, além de ser examinado por um médico clínico, realizar biópsia da lesão caso apresente ferida na pele ou mucosa, métodos que são necessários para o diagnóstico da doença. Você doará 30 a 60 ml de sangue (mais ou menos 2 colheres de sopa) para a pesquisa dos mecanismos de defesa do organismo. A retirada do pedaço da pele ou da ferida do nariz para o diagnóstico da sua doença, caso necessário, será feita com anestesia para você não sentir dor e parte deste material será utilizado para os estudos da defesa do seu corpo contra a *leishmania*. Caso o diagnóstico de leishmaniose não seja confirmado, todo o material obtido para pesquisa será destruído.

**Duração do estudo:** Após a assinatura do termo de consentimento e avaliação diagnóstica sua participação no estudo acabará 1 dia. Caso se constate que você tem a doença leishmaniose, todo mês você será examinado para determinar a cura da doença ou necessidade de utilização de nova série de Glucantime® ou de outra medicação, que também lhe será fornecido gratuitamente. Isto não faz parte do estudo.

**Confidencialidade:** Qualquer informação obtida durante este estudo só será do conhecimento da equipe médica. Você ou qualquer participante desse estudo não será identificado por nome nas publicações dos resultados do estudo.

**Análises de riscos e benefícios:** Caso esteja doente, o tratamento que você receberá (Glucantime®) é semelhante ao que todos os pacientes receberão participando ou não do estudo. Não existe nenhum procedimento adicional para os participantes do estudo, assim não existe também nenhum risco adicional para você.

**Retorno de benefícios para o sujeito e para a sociedade:** As leishmanioses são doenças relacionadas à reação do seu organismo contra a *Leishmania* e o conhecimento destas reações do seu corpo pode contribuir não só para o entendimento da doença como para o aparecimento de novas formas de tratamento ou controle da leishmaniose.

**Custos:** Você não terá custos com o tratamento com antimônio ou com outra droga para tratamento da leishmaniose caso haja necessidade de uso. Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo.

**Esclarecimentos:** Caso você precise de atendimento médico durante o estudo, você pode contatar um dos seguintes investigadores pelo telefone 71- 3237-7353: Dr. Edgar M. Carvalho, Dr. Paulo Machado e Dr. Luiz Henrique Guimarães. Caso você queira saber alguma coisa sobre seus direitos e de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Complexo Hospital Universitário Professor Edgard Santos, cujo endereço encontra-se no início deste consentimento ou pelo telefone: (71) 3283-8140

**Consentimento:** Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

Sim, eu concordo que a amostra de sangue e / ou pele possam ser guardadas para pesquisa no futuro.

Não, eu não concordo que a amostra de sangue e / ou pele possam ser guardadas para pesquisa no futuro.

---

Assinatura do participante

Data Hora

---

Assinatura da testemunha

Data Hora

#### COMPROMISSO DO PESQUISADOR

Discuti as questões acima apresentadas com os participantes do estudo ou com o seu representante legalmente autorizado. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e direitos relacionados a este projeto.

---

Assinatura do pesquisador

Data Hora

## Anexo II

### Parecer Consubstanciado de Projeto

**Título do Projeto:** DETERMINANTES DO HOSPEDEIRO E DO PARASITO NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR HUMANA: RESPOSTA IMUNE PROTETORA E PATOLÓGICA NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.

**Pesquisador Responsável:** Edgar Marcelino da Carvalho Filho

**Data da Versão:** 20/04/2012

**Cadastro:** 25/12

**Data do Parecer:** 20/04/2012

**Grupo e Área Temática:** 18. Cooperação estrangeira

#### Objetivos do Projeto

1. Determinar como células da resposta imune inata controlam a infecção por *L. braziliensis*.
2. Avaliar o papel da citocina linfopietina tímica estromal (TSLP) produzida por células normalmente existentes na pele, na resposta patológica associada à infecção por *L. braziliensis*.
3. Determinar como células TCD8+ participam da imunopatologia em pacientes com leishmaniose tegumentar.

#### Sumário do Projeto

A leishmaniose tegumentar é uma doença tropical negligenciada importante, que ocorre em todo mundo, com mais de 1,5 milhões de pessoas afetadas anualmente. No nosso meio a *Leishmania braziliensis* é o agente causal da leishmaniose cutânea (LC), da leishmaniose mucosa (LM) e da leishmaniose disseminada (LD). Embora a resposta Th1 e consequentemente a produção de IFN- $\gamma$  impeça a disseminação da doença, a patogênese da leishmaniose tegumentar americana (LTA) está associada a uma resposta Th1 exagerada e não apropriadamente modulada. Em contraste com estas formas clínicas, cerca de 10% dos indivíduos residentes em uma área de transmissão de *L. braziliensis*, a despeito da exposição a esse parasito, não apresentam evidências de doença clínica. Até o momento não é claro porque os indivíduos com a forma sub-clínica da infecção por *L. braziliensis* tem a capacidade de controlar a doença, a despeito de apresentarem uma resposta do tipo Th1 mais fraca quando comparada com a resposta dos pacientes com LC, LM e LD. A principal hipótese desse projeto é que o controle da doença em indivíduos com infecção sub-clínica é determinada pela resposta imune inata e que citocinas associadas à pele e células TCD8+ participam da destruição tecidual levando ao desenvolvimento da LC, LM e LD. Os principais objetivos são: 1) Determinar como células da resposta imune inata controlam a infecção por *L. braziliensis*; 2) Avaliar o papel da citocina Linfopietina Tímica Estromal (TSLP) produzida por células normalmente existentes na pele, na resposta patológica associada à infecção por *L. braziliensis*; 3) Determinar como células TCD8+ participam da imunopatologia em pacientes com leishmaniose tegumentar. Esses estudos permitirão conhecer como a proteção e a imunopatologia ocorrem após a infecção com *L. braziliensis*. Esses conhecimentos poderão ser aplicados na identificação de novos alvos terapêuticos e no desenvolvimento de vacinas.

Aspectos relevantes para avaliação	Situação
Título	Adequado
Relação dos Pesquisadores	Adequada
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas
Introdução	Adequada
Objetivos	Adequados
Método	
Tipo de projeto	Pesquisa em Seres Humanos
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 240 Na Instituição 0

Página 1-3  
Versão 01/2004

Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Menores de 18 anos
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco-benefício	Adequada
Uso de placebo	Não se aplica
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Armazenamento de material biológico	Adequado
Instrumentos de coleta de dados	Adequados
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim
Cronograma	Adequado
Data de início prevista	07/2012
Data de término prevista	07/2017
Orçamento	Adequado
Solicita recursos à instituição	Não
Fonte de financiamento externa	Outras fontes
Referências Bibliográficas	Adequadas

Recomendação

**Aprovar**

Comentários Gerais sobre o Projeto

O projeto de pesquisa cumpriu todos os requisitos da Resolução CNS 196/96.

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).


- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ e ao término do estudo.

**Projeto Aprovado.**

Página 2-3  
Versão 01/2004

  
ROBERTO BADANO, MD PhD  
Coordenador CEP  
CHUDPA



## Anexo III

### Normas de Publicação:

#### Preparing main manuscript text

General guidelines of the journal's style and language are given below.

**Overview of manuscript sections for Research articles** Manuscripts for Research articles submitted to BMC Infectious Diseases should be divided into the following sections (in this order):

**Title page**

**Abstract**

**Keywords**

**Background**

**Methods**

**Results and discussion**

**Conclusions**

**List of abbreviations used (if any)**

**Competing interests**

**Authors' contributions**

**Authors' information**

**Acknowledgements**

**Endnotes**

**References**

**Illustrations and figures (if any)**

**Tables and captions**

The Accession Numbers of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000, DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database (EMBL), DNA Data Bank of Japan (DDBJ), GenBank at the NCBI (GenBank), Protein Data Bank (PDB), Protein Information Resource (PIR) and the Swiss-Prot Protein Database (Swiss-Prot).

#### Title page

The title page should: provide the title of the article list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors indicate the corresponding author Please note: the title should include the study design, for example "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial X is a risk factor for Y: a case control study" abbreviations within the title should be avoided

#### Abstract

The Abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: Background, the context and purpose of the study; Methods, how the study was performed and statistical tests used; Results, the main findings; Conclusions, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. Trial registration, if your research article reports the results of a controlled health care intervention, please list your trial registry, along with the unique identifying number (e.g. Trial registration: Current Controlled Trials ISRCTN73824458). Please note that there should be no space between the letters and numbers of your trial registration number. We recommend manuscripts that report randomized controlled trials follow the CONSORT extension for abstracts.

#### Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

## **Background**

The Background section should be written in a way that is accessible to researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. Reports of clinical research should, where appropriate, include a summary of a search of the literature to indicate why this study was necessary and what it aimed to contribute to the field. The section should end with a brief statement of what is being reported in the article.

## **Methods**

The methods section should include the design of the study, the setting, the type of participants or materials involved, a clear description of all interventions and comparisons, and the type of analysis used, including a power calculation if appropriate. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses in the Methods section.

For studies involving human participants a statement detailing ethical approval and consent should be included in the methods section. For further details of the journal's editorial policies and ethical guidelines see 'About this journal'.

For further details of the journal's data-release policy, see the policy section in 'About this journal'.

## **Results and discussion**

The Results and discussion may be combined into a single section or presented separately. Results of statistical analysis should include, where appropriate, relative and absolute risks or risk reductions, and confidence intervals. The Results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

## **Conclusions**

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

## **List of abbreviations**

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

## **Competing interests**

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors must disclose any financial competing interests; they should also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

### **Financial competing interests**

In the past three years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.

Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.

Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you

received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify. Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

#### Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify. If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editorial office.

#### Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

According to ICMJE guidelines, An 'author' is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; 3) have given final approval of the version to be published; and 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

#### Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

#### Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript preparation. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design, in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study. If a language editor has made significant revision of the manuscript, we recommend that you acknowledge the editor by name, where possible.

The role of a scientific (medical) writer must be included in the acknowledgements section, including their source(s) of funding. We suggest wording such as 'We thank Jane Doe who provided medical writing services on behalf of XYZ Pharmaceuticals Ltd.'

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements

section.

## Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

## References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles, clinical trial registration records and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up to the first six before adding 'et al.'.

Any in press articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office. An Endnote style file is available.

Examples of the BMC Infectious Diseases reference style are shown below. Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style they may have to be retyped and carefully proofread.

All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Authors may wish to make use of reference management software to ensure that reference lists are correctly formatted. An example of such software is Papers, which is part of Springer Science+Business Media.

### Examples of the BMC Infectious Diseases reference style

#### Article within a journal

Smith JJ. The world of science. *Am J Sci.* 1999;36:234-5.

#### Article within a journal (no page numbers)

Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Medicine.* 2013;11:63.

#### Article within a journal by DOI

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med.* 2000; doi:10.1007/s801090000086.

#### Article within a journal supplement

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979;59 Suppl 1:26-32.

#### Book chapter, or an article within a book

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon

KW, editors. International review of cytology. London: Academic; 1980. p. 251-306.

OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)

Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. *Top Curr Chem*. 2007. doi:10.1007/128\_2006\_108.

Complete book, authored

Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed 15 Jan 1999.

Online database

Healthwise Knowledgebase. US Pharmacopeia, Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

Supplementary material/private homepage

Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

University site

Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec 1999.

FTP site

Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12 Nov 1999.

Organization site

ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb 2007.

Dataset with persistent identifier

Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

### **Preparing illustrations and figures**

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each figure should include a single illustration and should fit on a single page in portrait format. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustration file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the use of color figures.

Please read our figure preparation guidelines for detailed instructions on maximising the quality of your figures.

### **Formats**

The following file formats can be accepted:

PDF (preferred format for diagrams)

DOCX/DOC (single page only)

PPTX/PPT (single slide only)

EPS

PNG (preferred format for photos or images)

TIFF

JPEG

BMP

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the document, rather than being

a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

### **Preparing tables**

Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they should be concise. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in A4 portrait or landscape format. These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading may not be used; parts of the table can be highlighted using symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files.

Larger datasets or tables too wide for a portrait page can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls ) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

### **Preparing additional files**

Although BMC Infectious Diseases does not restrict the length and quantity of data included in an article, we encourage authors to provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

Please note: All Additional files will be published along with the article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files should be sent by email to [editorial@biomedcentral.com](mailto:editorial@biomedcentral.com), quoting the Manuscript ID number.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" can and should be included as additional files. Since many weblinks and URLs rapidly become broken, BMC Infectious Diseases requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a personal/departmental website. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Additional files can be in any format, and will be downloadable from the final published article as supplied by the author. We recommend CSV rather than PDF for tabular data.

Certain supported files formats are recognized and can be displayed to the user in the browser. These include most movie formats (for users with the Quicktime plugin), mini-websites prepared according to our guidelines, chemical structure files (MOL, PDB), geographic data files (KML).

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

File name (e.g. Additional file 1)

File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)

Title of data

Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional

file 1]'.

#### Additional file formats

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

#### Additional documentation

PDF (Adobe Acrobat)

Animations

SWF (Shockwave Flash)

Movies

MP4 (MPEG 4)

MOV (Quicktime)

Tabular data

XLS, XLSX (Excel Spreadsheet)

CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions.

#### Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root.

Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders.

Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters.

Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine.

Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article.

#### Style and language

##### General

Currently, BMC Infectious Diseases can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise.

BMC Infectious Diseases will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

#### **Language editing**

For authors who wish to have the language in their manuscript edited by a native-English speaker with scientific expertise, BioMed Central recommends Edanz. BioMed Central has arranged a 10% discount to the fee charged to BioMed Central authors by Edanz. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact Edanz directly to make arrangements for editing, and for pricing and payment details.

#### **Help and advice on scientific writing**

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on Writing titles and abstracts for scientific articles.

Tim Albert has produced for BioMed Central a list of tips for writing a scientific manuscript. American

Scientist also provides a list of resources for science writing. For more detailed guidance on preparing a manuscript and writing in English, please visit the BioMed Central author academy.

### **Abbreviations**

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript text.

### **Typography**

Please use double line spacing.

Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.

Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.

Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.

All lines and pages should be numbered. Authors are asked to ensure that line numbering is included in the main text file of their manuscript at the time of submission to facilitate peer-review. Once a manuscript has been accepted, line numbering should be removed from the manuscript before publication. For authors submitting their manuscript in Microsoft Word please do not insert page breaks in your manuscript to ensure page numbering is consistent between your text file and the PDF generated from your submission and used in the review process.

Use the BMC Infectious Diseases reference format.

Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted.

Please do not format the text in multiple columns.

Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.

Units

SI units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).