



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



**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA  
MORTE DA *Leishmania braziliensis* POR MONÓCITOS  
DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR  
AMERICANA**

**PEDRO PAULO OLIVEIRA CARNEIRO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**SALVADOR – (BAHIA), 2013**

C289 Carneiro, Pedro Paulo Oliveira

Avaliação dos mecanismos envolvidos na morte da *Leishmania braziliensis* por monócitos de pacientes com leishmaniose tegumentar americana / Pedro Paulo Oliveira Carneiro. – Salvador, 2014.

129f.

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

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.  
Faculdade de Medicina, 2014.

1. *Leishmania Braziliensis*. 2. Leishmaniose Tegumentar. 3. Leishmaniose Cutânea. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.993.161



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



**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA MORTE DA *Leishmania braziliensis* POR MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

**Pedro Paulo Oliveira Carneiro**  
**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 Infeciosas.

**SALVADOR – (BAHIA), 2013**

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

### **MEMBROS TITULARES:**

- Ricardo Gonçalves, professor adjunto no departamento de Patologia Geral, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Pesquisador do centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ, CPQRR, Minas Gerais.

- Washington Luis Conrado, pesquisador do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz (CPqGM, Fiocruz Bahia).

- Nicolaus Albert Schriefer, Professor adjunto da UFBA, Pesquisador associado do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos – HUPES – UFBA. Professor do Programa de Pós- graduação em Ciências da Saúde – UFBA.

### **MEMBROS SUPLENTE**

- Maria Olívia Amado Ramos Bacellar (Professora - orientadora), Professora do programa de pós-graduação em Imunologia - UFBA, Pesquisadora associada do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos – HUPES – UFBA. Professora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde -UFBA.

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

- National Institute of Health - NHI
- International Collaborations in Infectious Disease Research – Grant AI30639 e AI088650.
- Bolsa de estudos: Capes

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.*

*Charles Chaplin*

## Dedicatória

---

Dedico este trabalho a Deus, por ser o Mestre dos Mestres, Pai supremo.

A minha mãe Georgina Maria de Souza Oliveira *in memoriam*, pelo amor, dedicação e todos os ensinamentos para que eu me tornasse um ser humano de bem e do bem. Serei eternamente grato por tudo. Meu amor será eterno!

A minha avó Aurelina de Souza Oliveira, pelo amor incondicional. Agradeço por todo o sempre!

A tríade de tias (mães) Joselina Aparecida de Souza Oliveira, Luciene de Souza Oliveira e Marta Lúcia de Souza Oliveira, que me ensinaram a ficar de pé nos piores e melhores momentos da minha vida. Minha gratidão será eterna!

## **Agradecimento Especial**

---

### **Maria Olívia Amado Ramos Bacellar**

Sou-lhe eternamente grato por ter acreditar no meu potencial, por ter me dado a oportunidade de aprender diariamente o significado da dedicação profissional. Por ter me ensinado o valor da ética e comprometimento profissional.

Agradeço profundamente pela orientação prestada e pela amizade construída ao longo desses anos de trabalho.

Sou grato, por me ajudar a ter equilíbrio no momento mais doloroso e importante da minha vida.

Por ser o meu exemplo de excelente pesquisadora.

Obrigado por tudo !



## Agradecimentos

---

- A Dr. Edgar Carvalho, Chefe do Serviço de imunologia.
- A minha mãe Georgina Maria de Souza Oliveira, por tudo na minha vida;
- Aos colegas e amigos do serviço do serviço de imunologia.
- Aos amigos do laboratório de Imunoregulação; Aline Muniz, Michael Macedo, Ludmila Pollari, Thiago Cardoso e Jacilara Alexandrino, pelos bons momentos de dedicação a ciência, risos e apoio prestados.
- A Jacilara Alexandrino, pela amizade construída, troca de ensinamentos e pelos bons momentos passados na área endêmica de Corte de Pedra;
- A Rúbia Costa, pela amizade durante a academia e pela continuidade e apoio ao longo da pós graduação.
- A Alexandra Galvão, amiga/irmã, que me incentivou e junto a Jamile Fernandes, me ajudaram a entrar no serviço de imunologia.
- Aos meus amigos inseparáveis, pelo apoio e compreensão, em todos os momentos da minha vida, em especial a: Edjacy, Isabella, Laís, Fernanda, Ana Clara, Amanda, Muller, Marlos, Mateus, Guilherme.

- A Lilian Medina pela amizade construída na pós-graduação que levarei para a vida.
  
- Aos médicos pesquisadores do Serviço de Imunologia que dá suporte clínico avaliando os pacientes em Corte de Pedra. Em especial a todos os funcionários da área endêmica de Corte de Pedra, em especial a Ednaldo Lago e Neuza.
  
- A Ângela Giudice, e Tiago Cardoso, pela amizade e suporte técnico prestados.
  
- Aos funcionários do Serviço de Imunologia, pela cooperação constante e disponibilidade, em particular: Cristiano Sampaio, Orlando Sanches, Dilma Simplício e Érica Castilho.
  
- Aos pacientes da endêmica por participarem deste estudo. Obrigada por colaborarem com a nossa pesquisa.
  
- Aos meus Familiares, Aurelina, Joselina, Marta, Luciene, Estela, Mateus.
  
- A Richard Davis e Fernanda Novais pelas contribuições científicas fornecidas.
  
- A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
ÍNDICE DE TABELAS	15
ÍNDICE DE FIGURAS	16
<b>I. RESUMO</b>	<b>18</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
II.1 OBJETIVO GERAL	20
II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
<b>III. INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
<b>IV. REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>23</b>
IV.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)	23
IV.2 TRANSMISSÃO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	24
IV.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	25
IV.4 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	26
IV.5 MECANISMOS OXIDATIVOS ENVOLVIDOS NA MORTE DA LEISHMANIA	29
IV.6 FORMAÇÃO DO ÓXIDO NITRICO	32
IV.7 ESPÉCIES REATIVAS DE ÓXIGÊNIO	33
IV.8 OUTRAS MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NO CONTROLE DA INFECÇÃO POR LEISHMANIA	35
<b>V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
V.1 ÁREA ENDÊMICA DE CORTE DE PEDRA-BA	37
V.2 DESENHO DE ESTUDO	38
V.3 DEFINIÇÃO DOS CASOS	38
V.3.1. Leishmaniose Cutânea (LC)	38
V.3.2. Subclínicos (SC)	38

V.3.3. Controles Sadios (CS)	39
V.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	39
V.5. CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO	39
V.6. METODOLOGIA	40
V.6.1. Fluxograma representativo	40
V.6.2. Separação de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)	41
V.6.3. Análise da expressão de CD14 e CD16.	41
V.6.4. Preparação da <i>Leishmania braziliensis</i> para infecção – cepa 11245	42
V.6.5. Inibição da NADPH oxidase e da Óxido Nítrico Sintetase (iNOS)	43
V.6.6. Avaliação do burst oxidativo em monócitos	44
V.6.7. Avaliação da produção intracelular de óxido nítrico e das espécies reativas de oxigênio em monócitos	45
V.6.8. Viabilidade de promastigotas	47
V.6.9. Produção de Mieloperoxidase (MPO)	47
V.6.10. Análise de dados	49
V.6.11. Considerações éticas	49
<b>VI. ARTIGO</b>	51
<b>VII. RESULTADOS</b>	71
VII.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA POPULAÇÃO ESTUDADA	71
VII.2 AVALIAÇÃO DO BURST OXIDATIVO POR MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA APÓS INFECÇÃO POR <i>L.braziliensis</i>	72
VII.3 AVALIAÇÃO DO BURST OXIDATIVO POR MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS SUBCLÍNICOS APÓS INFECÇÃO POR <i>L.braziliensis</i>	74
VII.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO BURST OXIDATIVO APÓS A INIBIÇÃO DAS ENZIMAS NADPH-OXIDASE E iNOS EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA E DE INDIVÍDUOS SUBCLÍNICOS APÓS A INFECÇÃO COM <i>L.braziliensis</i>	76
VII.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO INTRACELULAR DE NO E ROS POR MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA APÓS A INFECÇÃO POR <i>L.braziliensis</i>	80

VII.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO INTRACELULAR DE NO E ROS POR MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS SUBCLÍNICOS APÓS A INFECÇÃO POR <i>L.braziliensis</i>	82
VII.7 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO E DA CARGA PARASITÁRIA DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA APÓS A INFECÇÃO POR <i>L. braziliensis</i>	84
VII.8 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO E DA CARGA PARASITÁRIA DE MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS SUBCLÍNICOS APÓS A INFECÇÃO POR <i>L. braziliensis</i>	87
VII.9 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO E DA CARGA PARASITÁRIA DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA E INDIVÍDUOS SUBCLÍNICOS EM 72 HORAS DE INFECÇÃO POR <i>L. braziliensis</i> APÓS A INIBIÇÃO DA NADPH OXIDASE E DA ÓXIDO NITRICO SINTETASE.	89
VII.10 AVALIAÇÃO DO PAPEL DE NO E DO ROS NO CONTROLE DA INFECÇÃO COM <i>L. braziliensis</i> EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA E DE INDIVÍDUOS SUBCLÍNICOS	91
VII.11 CORRELAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DOS OXIDANTES POR MONÓCITOS APÓS A INFECÇÃO POR <i>L. braziliensis</i> E O TAMANHO DA LESÃO EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA	93
VII.12 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MIELOPEROXIDASE POR MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA, INDIVÍDUOS SUBCLÍNICOS E CONTROLES SADIOS, APÓS A INFECÇÃO POR <i>L. braziliensis</i> .	95
<b>VIII. DISCUSSÃO</b>	97
<b>IX.SUMÁRIO DE RESULTADOS</b>	105
<b>X. PERSPECTIVAS DO ESTUDO</b>	107
<b>XI. CONCLUSÕES</b>	108
<b>XII. SUMMARY</b>	109
<b>XIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	111
<b>XIV. ANEXOS</b>	122
ANEXO I: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	122
ANEXO II: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE EM CONTROLES SADIOS	125
ANEXO III:PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	128
ANEXO IV: NORMAS DE PUBLICAÇÃO	129

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CD4	Grupo de Diferenciação 4
CD8	Grupo de Diferenciação 8
CD14	Grupo de Diferenciação 14
CD16	Grupo de Diferenciação 16
DHR	Dihidrorodamina
DPI	Diphenyleneiodonium
FITC	Isocianato de fluoresceína
IDR	Intradermo reação de Montenegro
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
iNOS	Óxido Nitrico Sintetase
L-NMMA	L-N <sup>G</sup> -monomethyl Arginine citrate
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NO	Óxido Nitrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PE	Ficoeritina
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Th1	Linfócitos T “helper” auxiliar tipo 1
Th2	Linfócitos T “helper” auxiliar tipo 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Aspectos epidemiológicos e clínicos dos pacientes com leishmaniose cutânea, indivíduos subclínicos e controles sadios.	51
---	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Geração das moléculas envolvidas com o burst oxidativo em macrófagos após estímulo exógeno (exemplo, a infecção por <i>Leishmania</i> ).	36
Figura 2- Localização da região de Corte de Pedra-BA	37
Figura 3- Centro de referência em Leishmaniose Dr. Jackson Costa em Corte de Pedra-BA.	37
Figura 4 - Representação gráfica da separação de monócitos a partir das CMSP utilizando marcação da população de monócitos com anticorpos monoclonais anti-CD14 (PerCP-Cy5.5) e anti-CD16 (PE).	42
Figura 5 - Representação gráfica da produção de burst oxidativo por monócitos a partir da separação das CMSPs.	44
Figura 6 - Representação gráfica da produção intracelular do NO e do ROS por monócitos a partir da separação das CMSPs	46
Figura 7 - Representação gráfica da produção de MPO por monócitos a partir da separação das CMSPs	48
Figura 8 - Expressão do burst oxidativo por monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea e controles sadios.	73
Figura 9 - Expressão do burst oxidativo por monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea, indivíduos subclínicos e controles sadios	75
Figura 10 - Expressão do burst oxidativo por monócitos de pacientes com LC e indivíduos SC após a inibição da NADPH oxidase e da iNOS.	78
Figura 11 - Expressão do burst oxidativo por monócitos infectados por <i>L.braziliensis</i> de pacientes com LC em comparação com indivíduos SC após a inibição da NADPH oxidase e da iNOS.	79
Figura 12 - Produção do NO e ROS por monócitos de pacientes com LC após a inibição das vias de produção dessas moléculas,	81
Figura 13- Produção do NO e ROS por monócitos de pacientes com SC e LC após a infecção com <i>L.braziliensis</i>	83
Figura 14 - Avaliação da infecção e da carga parasitária de monócitos após a infecção por <i>L.braziliensis</i>	86
Figura 15 - Avaliação da infecção e da carga parasitária de monócitos de indivíduos SC após a infecção por <i>L.braziliensis</i> na presença de inibidores do NO e do ROS	88



Figura 16 - Avaliação da infecção e da carga parasitária entre os monócitos de indivíduos LC e SC após a infecção por <i>L.braziliensis</i>	90
Figura 17 - Avaliação da viabilidade de promastigotas de <i>L.braziliensis</i> após a inibição das enzimas NADPH-oxidase e iNOS em monócitos de pacientes com LC e indivíduos subclínicos	92
Figura 18- Correlação entre a produção do NO e do ROS por monócitos após infecção com <i>L.braziliensis</i> com o tamanho da lesão de pacientes com LC	94
Figura 19- Determinação da produção de MPO em monócitos de pacientes com LC e SC.	96

## I. RESUMO

### **AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA MORTE DA *Leishmania braziliensis* POR MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

**Introdução:** Na leishmaniose tegumentar causada por *Leishmania braziliensis* a patogênese está associada a uma resposta Th1 exagerada e não apropriadamente modulada e existem várias evidências que essa resposta participa do desenvolvimento das lesões cutâneas observadas nessa doença. 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 e são considerados como tendo a forma subclínica da doença. Como a resposta imune adaptativa parece não estar envolvida na erradicação do parasito ou no controle da infecção, estudos sobre o papel das células da resposta imune inata no controle da infecção por *L. braziliensis* têm se mostrado de grande importância. Os monócitos/macrófagos são as principais células que abrigam a *Leishmania* e a sua ativação depende principalmente da produção de IFN- $\gamma$  por células T e NK, dando início a vários processos celulares como a geração de burst oxidativo. Dois grupos de oxidantes são importantes no controle da infecção por *Leishmania*, os Reativos de Oxigênio (ROS) e o Óxido Nítrico (NO), que são produzidos em resposta à fagocitose e após a ativação dessas células, respectivamente. Em modelo murino observa-se um importante papel do NO na morte da *Leishmania* pelos macrófagos, entretanto os mecanismos utilizados por estas células em humanos ainda não são bem estabelecidos. **Objetivo:** Avaliar o papel do NO e do ROS no controle da infecção por *L. braziliensis* por monócitos de pacientes com Leishmaniose Cutânea (LC) e de indivíduos subclínicos (SC). **Métodos:** Monócitos de pacientes com LC (n=25) e de indivíduos subclínicos (n=09) foram infectados com *L. braziliensis* na proporção de 5:1 por diferentes períodos de tempo. A avaliação da produção dos radicais oxidativos, através da técnica de citometria de fluxo foi realizada pela oxidação da Dihidrorodamina 123 (DHR-123), após a inibição da produção de NO (L-NMMA, inibidor da enzima óxido nítrico sintetase) e após a inibição da produção de ROS (DPI, inibidor da enzima NADPH-oxidase). A produção

intracelular do NO e do ROS foi determinada com o uso de sondas intracelulares específicas (DAF FM diacetato e o CMH-2DCFDA) através da citometria de fluxo. Para avaliar os efeitos desses oxidantes no controle da infecção nos monócitos foi utilizada a técnica de microscopia óptica para avaliação do número de células infectadas e do número de amastigotas.

**Resultados:** Após a infecção pela *L. braziliensis* a expressão do burst oxidativo por monócitos de pacientes com LC foi maior quando comparado com os indivíduos SC e controles sadios. Após a inibição da enzima NADPH oxidase, foi observado uma diminuição significativa da expressão do burst oxidativo por monócitos de pacientes LC sugerindo que haveria maior produção de ROS por essas células. A avaliação da produção intracelular desses oxidantes mostrou que a produção de ROS é maior que a produção de NO nos pacientes com LC. A produção de NO foi maior nos pacientes LC quando comparado com a produção por células dos indivíduos SC bem como a produção de ROS que também foi maior nos pacientes com LC, porém sem diferença estatística. A produção de NO apresentou uma correlação positiva com o tamanho das lesões dos pacientes com LC. Após 72 horas de infecção houve diminuição significativa no número de células infectadas e na carga parasitária nas culturas de células que tiveram a NADPH oxidase inibida. Esses resultados foram associados com a viabilidade das promastigotas no mesmo período de tempo e nas mesmas condições.

**Conclusões:** Esses resultados sugerem que a produção de ROS e não de NO parece ser importante no controle da infecção por *L. braziliensis* por monócitos de pacientes com LC. Adicionalmente, a produção dessa molécula parece estar mais associada ao desenvolvimento da lesão nesses pacientes. Em relação aos indivíduos subclínicos não existe indicação que essas moléculas estejam envolvidas no controle da infecção.

**Palavras-chave:** *Leishmania braziliensis*; Leishmaniose Cutânea; óxido nítrico; Espécies reativas de oxigênio.

## **II. OBJETIVOS**

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

Avaliar os mecanismos microbicidas envolvidos no controle da infecção por *L. braziliensis* em monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea.

### **II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Determinar a produção de óxido nítrico (NO) e das espécies reativas de oxigênio (ROS) por monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea, indivíduos subclínicos e controles sadios após a infecção por *L. braziliensis*.
- 2- Avaliar o papel de inibidores da via do óxido nítrico (através da inibição da enzima iNOS ) e da via do ROS (através da inibição da enzima NADPH oxidase ) no controle da infecção por monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea e de indivíduos subclínicos infectados por *L. braziliensis*.
- 3- Determinar a produção da mieloperoxidase em monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea e de indivíduos com infecção subclínica após a infecção por *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). Dentre as manifestações da leishmaniose tegumentar observamos as formas cutânea (LC), mucosa (LM), disseminada (LD) e cutânea difusa (LCD). As formas clínicas da doença estão relacionadas com a espécie de *Leishmania* infectante, a região geográfica e os fatores da resposta imune do hospedeiro.

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).

Nas diferentes manifestações clínicas da doença, ao penetrar no hospedeiro a *Leishmania* interage com diferentes tipos celulares da resposta imune inata, incluindo neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. As células dendríticas, desempenham um papel importante na resistência à infecção por *Leishmania* através da apresentação antigênica, ativação de células Th1 e produção de IL-12 (Lemos, 2004; Von Stebut, 1998). Os macrófagos são as principais células que albergam o protozoário e conseqüentemente a sua sobrevivência ou morte dependem da ativação dessas células. A ativação dos macrófagos, consiste no aumento da expressão de HLA-DR, e de moléculas co-estimulatórias, produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12 e TNF), óxido

nítrico (NO) e quimiocinas. A produção de IFN- $\gamma$  por células NK e células T é considerada o principal mecanismo de ativação de macrófagos para matar a *Leishmania*.

Alguns processos celulares são iniciados após a ativação dos macrófagos, incluindo a produção fagolisossomal de enzimas de degradação, como proteases, nucleases, fosfatases, lipases, esterases, bem como a geração de reações oxidativas (Liew, 1990). Dois importantes oxidantes são críticos no controle da infecção por *Leishmania*, o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o óxido nítrico (NO). Durante a fase inicial da infecção por *Leishmania* o superóxido é produzido como parte do burst oxidativo dos macrófagos em resposta a fagocitose (Channon *et al.*, 1984; Miao e Clair, 2009). O segundo oxidante produzido pelos macrófagos é o óxido nítrico, que ao contrário do superóxido, é gerado após a ativação dos macrófagos pelo IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Evans *et al.*, 1984; Gantt *et al.*, 2001).

Os mecanismos utilizados pelos macrófagos humanos para matar a *Leishmania* ainda não são bem estabelecidos. Enquanto em camundongos tem sido observado um papel importante do NO no processo de morte do parasito, em humanos a participação dessa molécula ainda é questionável (Assreuy *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1993; Miao *et al.*, 2009). Baseado em estudos que avaliam o papel das moléculas oxidantes nas diferentes espécies de *Leishmania* e a escassez de trabalhos em humanos, nosso estudo se propõe a avaliar o papel do óxido nítrico e das espécies reativas de oxigênio (ROS), no controle da infecção por *L. braziliensis* em monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea.

## **IV. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **IV.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)**

As Leishmanioses são um grupo de doenças tropicais negligenciadas causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, determinando as formas clínicas tegumentar e visceral da doença. Representam um importante problema de saúde pública em mais de 80 países das Américas do Sul e Central, África e Ásia (Alvar *et al.*, 2012). Endêmica em 98 países e 3 territórios, principalmente na Ásia, África e Américas do Sul e Central, a leishmaniose ampliou sua distribuição geográfica consideravelmente nos últimos anos, por causa da globalização econômica e do aumento do fluxo migratório de indivíduos não imunes para áreas endêmicas. São 1,6 milhões de novos casos por ano, sendo 1,2 milhão de leishmaniose cutânea e 400 mil de leishmaniose visceral (Alvar *et al.*, 2012).

No Brasil as leishmanioses são endêmicas e apresentam-se em constante expansão geográfica. A leishmaniose visceral (LV) atinge 22 estados e possui uma prevalência de 3000 casos por ano, enquanto que a leishmaniose tegumentar é descrita em vários municípios de todas as unidades da federação, sendo registradas em média cerca de 30.000 novos casos por ano. A maior incidência da doença ocorre no norte e nordeste (Ministério Da Saúde, 2009).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) possui alta incidência no Estado da Bahia, cerca de 22/100.000 habitantes, sendo distribuídas em áreas

agrícolas e em regiões de desmatamento. Uma importante área endêmica da LTA é a vila de Corte de Pedra, pertencente ao município de Presidente Tancredo Neves, localizada a 280 km da capital Salvador, onde em 2010 foram notificados 1.556 novos casos da doença.

A leishmaniose visceral não ocorre nesta região, entretanto além da *L. braziliensis*, *L. amazonensis* foi identificada na vila de Corte de Pedra, contudo, apenas *L. braziliensis* tem sido isolado nos últimos 15 anos.(Jirmanus *et al.*, 2012). Formas clínicas da infecção por *L. braziliensis* incluem leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose mucosa e leishmaniose disseminada. Mais recentemente, as formas atípicas da doença têm sido descritos, tais como lesões verrucosas e múltiplas lesões nodulares em uma área específica do corpo (Guimarães *et al.*, 2009).

#### **IV.2 TRANSMISSÃO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

A transmissão da leishmaniose ocorre através do vetor fêmea hematófago do gênero *Phlebotomus* no velho mundo e *Lutzomyia* no novo mundo. A *Leishmania spp.* se multiplica no trato digestivo do vetor e os parasitas são transmitidos para o hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo do flebótomo vetor. No interior dos vetores, os parasitas do gênero *Leishmania* encontram-se na forma de promastigotas, entretanto após a inoculação na derme do hospedeiro vertebrado, estes parasitas são internalizados, por fagócitos e transformam-se em amastigotas, que são capazes de sobreviver dentro dos vacúolos parasitóforos. Neste ambiente as formas amastigotas multiplicam-se por divisão binária, resistindo aos mecanismos microbicidas dos fagócitos, principalmente macrófagos. Eventualmente, as células infectadas se



rompem, liberando as amastigotas que podem infectar novas células. Durante um novo repasto sanguíneo, o flebótomo ingere células infectadas. Uma vez no interior do trato digestivo do vetor, as amastigotas diferenciam-se em promastigotas metacíclicas (Rittig e Bogdan, 2000).

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

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), leishmaniose cutânea difusa (LCD) (Marsden, 1985, Carvalho *et al.*, 2012).

A leishmaniose cutânea se caracteriza pela presença de uma lesão ulcerativa e é diagnosticada através do teste de hipersensibilidade tardia positivo (DTH+) ao antígeno de *Leishmania*, identificação do parasito através da cultura do aspirado de lesão, através da técnica de PCR ou histopatologia compatível com LC. É a forma mais comum da doença representando 90 a 95% dos casos da LTA e se manifesta com ulceração cutânea única, bordas elevadas granulomatosas, geralmente autolimitada, podendo ocorrer cura espontânea (Bittencourt e Barral, 1991). A lesão cutânea se instala no sítio de entrada do parasita após períodos de incubação estimados entre 2 semanas e alguns meses. 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 indivíduos com a LC evolui para a forma mais grave da doença, a

leishmaniose mucosa, que é caracterizada por uma exacerbada imunidade mediada por células e severas lesões de desenvolvimento lento e progressivo que comprometem a região mucosa e submucosa, principalmente o nariz, boca e orofaringe (Marsden, 1986; Bacellar *et al.*, 2002; LESSA *et al.*, 2011).

A leishmaniose cutânea disseminada é a forma de leishmaniose emergente no nordeste do Brasil, causada na maioria das vezes por *L. braziliensis*. Esta forma clínica se distingue por apresentar numerosas lesões papulosas e acneiformes não ulcerativas, localizadas na face, tronco e membros. Após a formação da lesão primária, parasitos são disseminados pelo sangue ou via linfática estabelecendo uma infecção que o tempo de incubação ocorre por 24 horas, o que pode justificar as lesões distantes do local da picada (Carvalho *et al.*, 1994; Turetz *et al.*, 2002 ).

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) ou assintomáticos (Follador *et al.*, 2002,; Ben Salah *et al.*, 2005; Novoa *et al.*, 2011).

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

O desenvolvimento de uma resposta imunológica protetora para patógenos intracelulares requer a ação de células da imunidade inata e adaptativa. Após a infecção por *Leishmania* diferentes tipos de células da

imunidade inata interagem com o parasita. Embora os macrófagos sejam as principais células hospedeiras da *Leishmania*, estudos utilizando modelos animais têm demonstrado que neutrófilos e células dendríticas são também capazes de fagocitar o parasito na fase inicial da infecção (Pearson *et al.*, 1981; Gorak *et al.*, 1998). Os neutrófilos proporcionam um importante elo entre a imunidade inata e adaptativa, durante as infecções parasitárias. Estas células podem interagir com os monócitos, células dendríticas, linfócitos T e B por meio de contato célula-célula, produtos secretados, condução de resposta inflamatória e reparação tecidual (Nathan *et al.*, 2006; Charmoy *et al.*, 2010).

Os monócitos são células da linhagem mielomonocítica, que circulam na corrente sanguínea com uma meia-vida de 1-3 dias. Estas células são de grande importância na resposta imune contra *Leishmania*, desde quando elas migram para o sítio da inflamação se diferenciando em macrófagos, principais células responsáveis pela eliminação de patógenos intracelulares, ou podem se diferenciar em células dendríticas, principais células apresentadoras de antígenos (Mosser e Edwards, 2008; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2000). Cerca de 90% dos monócitos são clássicos (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>), e os 10% restantes são subdivididos em intermediários (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup>) e não clássicos (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>++</sup>), sendo os intermediários encontrados em menor porcentagem (Ziegler-Heitbrock *et al.* 2010).

Sendo a *Leishmania* um organismo intracelular obrigatório, o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra este parasito é através da produção de IFN- $\gamma$ , necessária para a ativação de macrófagos e síntese de derivados de O<sub>2</sub> a exemplo do óxido nítrico (NO) e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Scott *et al.*, 1988).

A interleucina-12, produzida por macrófagos, células dendríticas e interferon-gama (IFN-  $\gamma$ ) produzidos pelas células NK e células T, ativadas anteriormente, promovem o desenvolvimento de células Th1, enquanto que a IL-4 induz o desenvolvimento de células Th2. A subpopulação de células Th1, é importante para a indução de resistência a leishmaniose, produzindo IFN-  $\gamma$ , e fator de necrose tumoral-alfa (TNF-  $\alpha$ ), que desempenham um importante papel nas respostas imunes celulares contra patógenos intracelulares, ativando macrófagos para a eliminação do parasito (Liew *et al.*, 1999). Por outro lado, as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, e estão associados com a susceptibilidade a leishmaniose em modelos murinos (Chatelain *et al.*, 1999).

Atualmente, já está comprovado que a resposta imune participa da lesão tecidual na leishmaniose tegumentar. Ribeiro-de-Jesus *et al.* (1998) mostraram que pacientes com LC e LM produzem níveis elevados de IFN-  $\gamma$  e TNF, mas ao invés de controlar a infecção, desenvolvem úlceras cutâneas e mucosas. 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 e Barral, 1991; Mendes *et al.*, 2013). Algumas evidências têm sido acumuladas de que a resposta imune participa da lesão tecidual na leishmaniose tegumentar: 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).

#### **IV.5 MECANISMOS OXIDATIVOS ENVOLVIDOS NA MORTE DA LEISHMANIA**

Vários processos celulares, são iniciados após a ativação dos macrófagos, incluindo a produção fagolisossomal de enzimas de degradação como: proteases, nucleases, fosfatases, lipases, esterases, bem como a geração de estresse oxidativo (Teixeira *et al.*, 2005). Dois importantes oxidantes são críticos no controle da infecção por *Leishmania*, o superóxido ( $O_2^-$ ) e o óxido nítrico (NO) (Channon *et al.*, 1984; Miao e Clair, 2009 ). Durante a fase inicial da infecção por *Leishmania*, o  $O_2^-$  é produzido como parte do burst respiratório dos macrófagos em resposta a fagocitose (Miao e Clair, 2009). A produção de superóxido é catalisada pela NADPH oxidase. O superóxido é um precursor de outros oxidantes prejudiciais ao parasita, tais como o  $H_2O_2$  (peróxido de

hidrogênio), que é formado através da dismutação de  $O_2^-$  em uma reação catalisada pelo superóxido dismutase (Paramchuk *et al.*, 1997).

A segunda molécula anti-*Leishmania* produzido pelos macrófagos é o NO, que ao contrário do  $O_2^-$ , que é gerado durante a fagocitose do parasita, o NO é produzido após a ativação dos macrófagos pelo IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Evans *et al.*, 1993; Gantt *et al.*, 2001). O NO é um produto do metabolismo celular gerado a partir da enzima regulatória NO sintetase (NOS), existindo três isoformas desta enzima, sendo elas as neuronais, induzíveis e endotelial (nNOS, iNOS e eNOS). Contudo a iNOS é a responsável pela produção de NO em macrófagos, catalisando a oxidação de L-arginina para L-citrulina (revisado por Van Assche, 2011). Estudo realizado por Blos *et al.*, (2003), utilizando modelo murino, demonstrou o importante papel da iNOS no controle da carga parasitária em células infectadas por *L. major*, pois na ausência da enzima percebeu-se o 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.

Os mecanismos utilizados por macrófagos humanos para matar *Leishmania* ainda não estão bem estabelecidos. Enquanto em camundongos tem sido observado um papel importante da produção de NO no processo de morte da *Leishmania*, em humanos, a participação dessa molécula ainda é questionável (Liew, 1991 Assreuy *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1993; Miao e Clair, 2009). Estudos mais recentes mostraram que a co-cultura de neutrófilos com macrófagos infectados por *L. braziliensis* levou a uma forte produção de  $O_2^-$  após 2 horas de infecção enquanto a produção de NO permaneceu inalterada (Novais *et al.*, 2009). A interação entre NO e  $O_2^-$  leva a formação do

peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) que tem se mostrado ter um maior efeito tóxico *in vitro* em amastigotas quando comparado com os efeitos do NO (Linares *et al.*, 2001).

As leishmanias desenvolveram alguns mecanismos de auto-proteção contra oxidantes produzidos pelos fagócitos, incluindo o revestimento da sua superfície com glicolipídios chamados lipofosfoglicanos e a produção de moléculas anti-oxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e NG-monometil-L-arginina (L-NMMA) (Khouri *et al.*, 2009; Oza *et al.*, 2005). Os SODs, desempenham um papel crucial no controle do estresse oxidativo em células eucarióticas (Getachew e Gedamu, 2007). Estudos recentes em modelos murinos demonstraram a importância dessa enzima para a defesa do parasita contra reações oxidativas, onde a sua deficiência deixou a *Leishmania* susceptível a ação de  $\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , percebendo-se uma redução das amastigotas de *L. donovani* no interior dos macrófagos (Ghosh *et al.*, 2003). Em 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 parasita em macrófagos humanos (Gantt *et al.*, 2001).

## IV.6 FORMAÇÃO DO ÓXIDO NITRICO

Entre os anos de 1980 e 1990, o óxido nítrico teve o seu papel no sistema imunológico bem descrito, sendo definido como o produto de células da imunidade, ativada por citocinas, compostos microbianos ou ambos. (Nathan, 1992; Revisado por Bogdan, 2011). O NO é sintetizado a partir da L-arginina por três isoformas da óxido nítrico sintetase (NOS), dois dos quais (eNOS e nNOS) são constitutivamente expressos e são reguladas de forma aguda por cálcio / calmodulina e fosforilação, enquanto que a terceira (iNOS) é induzida durante a inflamação e produz níveis mais elevados de NO durante um período mais longo. Pode haver também uma isoforma mitocondrial (mtNOS), mas a sua origem e situação ainda não é clara (Giulivi, *et al.*, 1998 ;Ghafourifar, *et al.*, 1999). O NO também pode ser produzido a partir do nitrito em uma reação não enzimática, por um baixo pH (pH <5), por exemplo, durante a isquemia. O NO difunde-se rapidamente, tanto através da água quanto das membranas, entretanto, de modo algum se difunde de uma célula a outra (Revisado por Brown, 2002).

A geração de NO é uma característica das células do sistema imunológico (células dendríticas, células NK, mastócitos e células fagocíticas, incluindo monócitos, macrófagos, células microgliais de Kupffer, eosinófilos e neutrófilos), bem como em outras células envolvidas na resposta imune (células endoteliais, células epiteliais, células do músculo liso vascular, fibroblastos, condrócitos, queratinócitos, hepatócitos, células mesangiais e células de Schwann (Robinson *et al.*, 1994).



A ativação do gene promotor da iNOS, por parte das citocinas, é um importante meio de ativação da enzima óxido nítrico sintetase. A lista de fatores de transcrição que participam da ativação inclui o NF- $\kappa$ B, AP-1, o transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT-1 $\alpha$ ), interferon regulatório fator-1 (IRF-1), fator nuclear de interleucina-6 (NF-IL-6). O NO exerce um efeito bifásico sobre a transcrição da iNOS, onde baixas concentrações de NO, ativa o NF- $\kappa$ B, favorecendo uma regulação positiva da enzima iNOS. Altas concentrações têm o efeito oposto, o que pode ajudar a prevenir a superprodução de NO (Ganster *et al.*, 2001).

A concentração fisiológica do NO é incerta, entretanto, estima-se que seja entre 0,1 e 100nM. Nos macrófagos a óxido nítrico sintetase, utiliza o dióxigênio (O<sub>2</sub>), NADPH e L-arginina ou L-homoarginina como co-substratos. Essa enzima realiza a oxidação de cinco elétrons do nitrogênio da guanilil ciclase para produzir um radical óxido nítrico com um nitrogênio de vida curta centralizado. O óxido nítrico reage com ele mesmo, oxigênio e água para gerar o radical dióxido de nitrogênio e o acúmulo de produtos finais, como o nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Kwon, *et al.*, 1990; Nathan, *et al.*, 1991).

#### **IV.7. ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (ROS)**

Os neutrófilos e macrófagos produzem ROS em resposta à fagocitose por ligantes de receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Os padrões reconhecidos por PRRs pode ser tanto de origem patogênica (padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs)) ou induzida por padrões de perigo (padrões moleculares associados a danos (DAMP'S)) (Carta *et al.*,

2009). A ativação endotelial também pode induzir a produção de ROS por neutrófilos. Em resposta a estes sinais, a Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH)-oxidase dependente de fagócitos (Nox2, também conhecida como phox ou gp91phox) é constituída e o superóxido é produzido a partir do oxigênio molecular (Mizrahi *et al.*, 2006). O superóxido pode ser dismutado em peróxido de hidrogênio, o qual, por sua vez, pode gerar radicais hidroxilas e outras espécies reativas de oxigênio. Os macrófagos produzem ROS em quantidades mais elevadas do que os neutrófilos (Nathan e Shiloh, 2000).

Na leishmaniose, os primeiros eventos contra a *Leishmania* ocorrem durante a resposta imune inata. Os principais eventos iniciais na interação *Leishmania*-macrófago são o reconhecimento, seguido por internalização do parasita. O reconhecimento do parasita pode induzir a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos, como o superóxido ( $O_2^-$ ) (Channon *et al.*, 1984) . A produção de  $O_2^-$  é dependente do recrutamento da NADPH oxidase (NOX), onde as suas subunidades são direcionadas para a membrana do fagossomo nascente, resultando na constituição final da NOX (Almeida *et al.*, 2012). O  $O_2^-$  pode ser produzido pelos macrófagos, mesmo sem qualquer ativação anterior, durante o primeiro contato do parasita com a célula hospedeira. Dependendo da espécie de *Leishmania* o  $O_2^-$  e o NO desempenham um papel crucial no controle das infecções. Além da sua toxicidade própria, o superóxido é precursor de outros ROS, tais como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila (HO), Hipoclorito (HOCl) (Assreuy *et al.*, 1994; Mukbel *et al.*, 2007 ). Um estudo *in vitro* demonstrou que existe uma associação entre altos níveis de  $O_2^-$  e a capacidade leishmanicida

das células do hospedeiro (Khouri *et al.*, 2009; Kavooosi *et al.*, 2009; Vale-Costa *et al.*, 2013).

#### **IV.8. OUTRAS MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NO CONTROLE DA INFECÇÃO POR LEISHMANIA**

Os mecanismos celulares e moleculares do ROS e as suas atividades citotóxicas ainda não são bem descritas para *Leishmania*. Além disso, a susceptibilidade de ROS parece depender do estágio do parasita. (Holzmuller *et al.*, 2005).

A interação entre os radicais NO e o  $O_2^-$  leva a formação do ONOO<sup>-</sup>. A produção do peroxinitrito tem demonstrado um efeito tóxico *in vitro* a amastigotas de *Leishmania* superior ao efeito do NO (Blough *et al.*, 1985; Beckman *et al.*, 1990). Os resultados *in vivo* sugerem que essa toxicidade é causada por nitração de proteínas da membrana do parasita. Alguns estudos concluem que o  $H_2O_2$  e ONOO<sup>-</sup> apresentam maior citotoxicidade para *Leishmania* em comparação com  $O_2^-$  e NO (Van-Assche *et al.*, 2011). A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada nos grânulos azurofílicos de neutrófilos de mamíferos e também identificada em monócitos humanos (Klebanoff 1970; Mollinedo *et al.*, 2010). Estas células possuem um sistema composto da MPO e  $H_2O_2$  para matar uma variedade de microrganismos intracelulares. MPO pode estar envolvido em aumentar a atividade citotóxica de  $H_2O_2$  e  $O_2^-$  (Dewald *et al.*, 1979). O  $H_2O_2$  ou outros intermediários de oxigênio podem mediar os efeitos tóxicos nos macrófagos diretamente ou em combinação com a MPO. A baixa atividade de MPO observada em pacientes



## V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

### V.1 ÁREA ENDÊMICA DE CORTE DE PEDRA-BA

A vila de Corte de Pedra pertence ao município de Presidente Tancredo Neves, que está localizado no Sudeste do estado da Bahia, a 280 km de Salvador, capital da Bahia. Nesta área está localizado o posto de saúde que atende uma população de aproximadamente 10 municípios. Médicos vinculados ao Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (Com-HUPES) da Universidade Federal da Bahia visitam esta região e dão assistência aos indivíduos acometidos pela leishmaniose. O vilarejo também recebe apoio de agentes de saúde, residentes na vila, que são treinados para visitar famílias e recrutar pacientes para realização de pesquisas e acompanhamento clínico.



Figura 2- Localização da região de Corte de Pedra-BA. **Fonte:** google imagens



Figura 3- Centro de referência em Leishmaniose Dr. Jackson M.L.Costa - Corte de Pedra - BA

## **V.2 DESENHO DE ESTUDO**

Trata-se de um estudo de corte transversal, onde indivíduos residentes de uma área endêmica para leishmaniose tegumentar americana foram selecionados após aceitação para participar do estudo. No total foram incluídos 34 pacientes para o estudo, sendo 25 indivíduos diagnosticados com leishmaniose cutânea e 9 indivíduos identificados com a forma subclínica da doença.

## **V.3 DEFINIÇÃO DOS CASOS**

### **V.3.1. Leishmaniose Cutânea (LC)**

É definida como a presença de lesão 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. Atualmente, o diagnóstico também tem sido realizado através da Reação da Polimerase em Cadeia quantitativa (qPCR) de biópsias das amostras de lesões.

### **V.3.2. Indivíduos com Infecção Subclínica por *L.braziliensis* (SC)**

Foram considerados como indivíduos com infecção subclínica os familiares de pacientes com leishmaniose cutânea residentes no mesmo domicílio que apresentavam o teste positivo de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* e/ou produção *in vitro* de IFN- $\gamma$  antígeno específica sem evidência de doença (Schnorr *et al.*, 2012).

### **V.3.3. Controles Sadios (CS)**

Os indivíduos sadios são definidos como indivíduos não residentes na área endêmica de Corte de Pedra sem apresentarem diagnóstico para outras doenças infecciosas e sem possuírem história pregressa de LTA e que aceitaram participar do estudo.

### **V.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

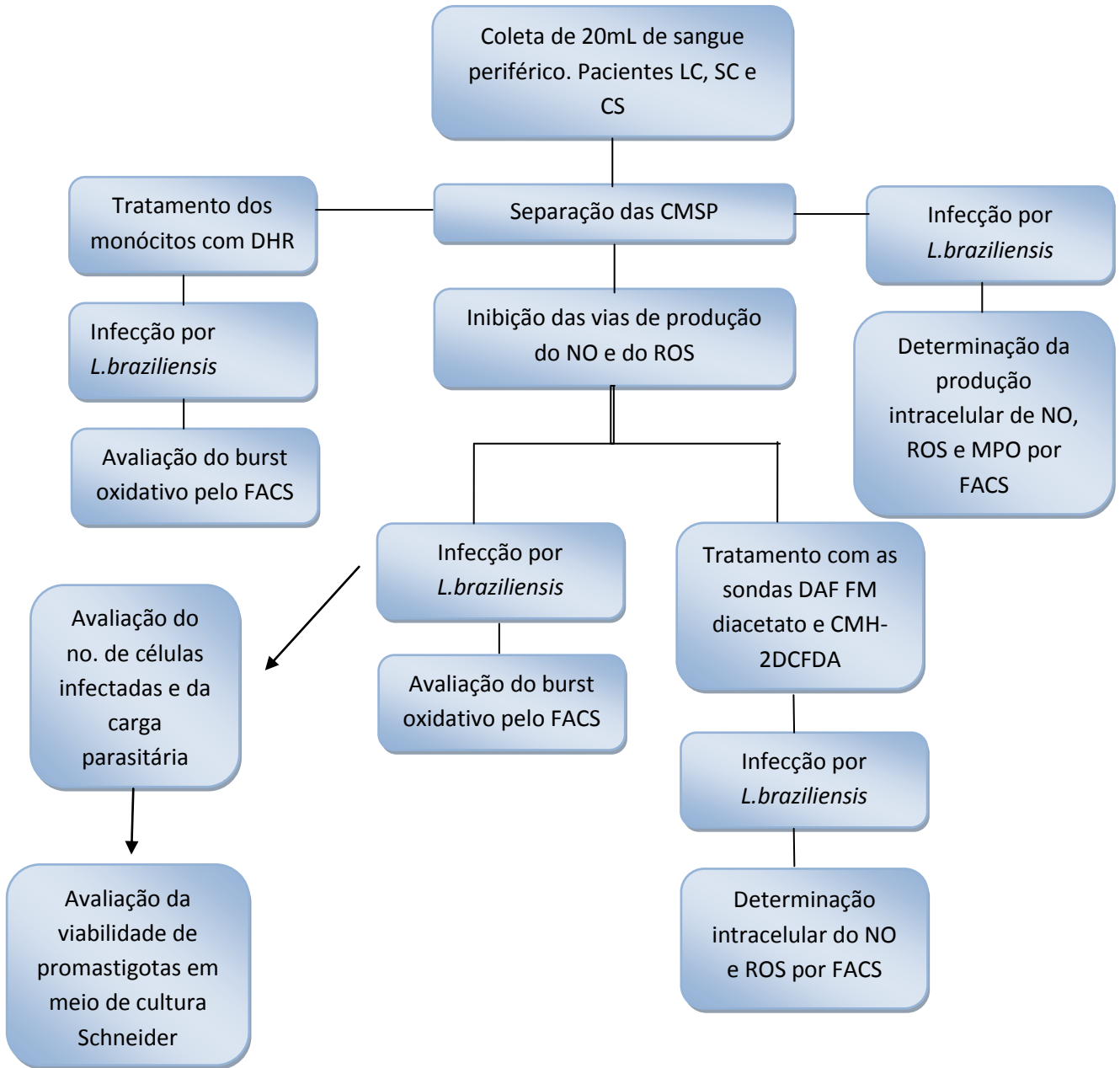
Pacientes com leishmaniose cutânea, subclínicos e os controles sadios, foram selecionados com base nos critérios clínicos já relatados. Foram selecionados indivíduos de qualquer gênero, com idade superior a 15 anos e inferior a 60, residentes na área endêmica de Corte de Pedra, com diagnóstico de LC, presença de lesão cutânea não superior a 60 dias e virgens de tratamento. Os indivíduos com reação de Montenegro positiva e/ou com produção de IFN- $\gamma$  e que não apresentaram a doença (indivíduos subclínicos), foram convidados a participar do estudo. Todos os indivíduos foram voluntários, que aceitaram participar do estudo e o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE), foi lido atentamente para os participantes e assinado quando aceitaram participar do estudo.

### **V.5. CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO**

Pacientes com sorologia positiva para HIV e portadores de doenças debilitantes como insuficiência renal, insuficiência hepática e diabetes mellitus, indivíduos que tenham feito uso de drogas imunossupressoras ou apresentem condições que possam alterar a resposta imune ou ainda que contra indiquem a doação de sangue para a avaliação sorológica como, por exemplo, menores com idade inferior a 15 anos e gestantes.

## V.6. METODOLOGIA

### V.6.1 Fluxograma representativo da metodologia



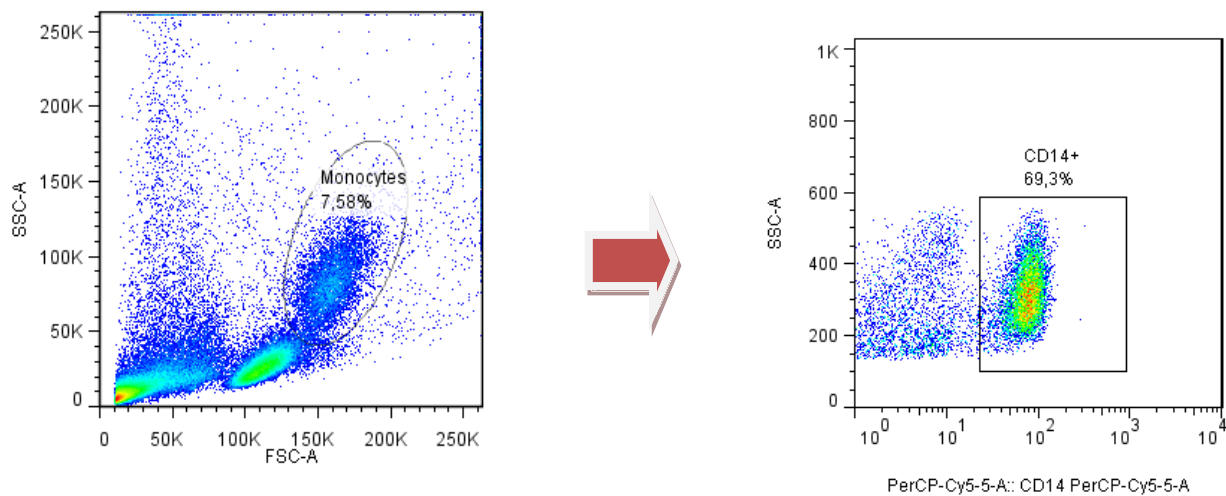


### **V.6.2. Separação de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)**

Foram coletadas 20 mL de sangue periférico heparinizado de pacientes LC, indivíduos SC e doadores saudáveis, diluídos 1:2 em solução salina estéril a 0.9%. As células foram separadas por gradiente de densidade, Ficoll Hypaque™ Plus (GE healthcare, Biosciences AB Durham, NC, USA), centrifugadas a 1490 rpm por 30 minutos. Após a separação as células foram aspiradas e lavadas 3 vezes com solução salina estéril a 0,9% a 1290 rpm. As células foram contadas através da câmara de Neubauer, ajustadas a uma concentração de  $1 \times 10^6$  células por tubo para citometria de fluxo (FACS) e ressuspensas em meio RPMI (RPMI 1640, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA), onde foram adicionados 10 UI/mL de gentamicina e 10% de Soro Bovina Fetal (Gibco Laboratories, invitrogen™ América do Sul).

### **V.6.3. Análise da expressão de CD14**

A expressão de CD14 foi utilizada para a caracterização fenotípica da população de monócitos, após a separação de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LC, SC e CS, através da técnica de citometria de fluxo. Foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD14 (PerCP-Cy5.5, BD Pharmingen™) diluídos na concentração de 1:10 com a finalidade de avaliar a frequência de monócitos destes pacientes. A contagem dos eventos foi realizada por citometria de fluxo, considerando os parâmetros de tamanho (SSC) e granulosidade (FSC) para a delimitação da região dos monócitos. (Figura 2).



**Figura 4: Representação gráfica da separação de monócitos a partir das CMSP utilizando marcação da população de monócitos com anticorpos monoclonais anti-CD14 (PerCP-Cy5.5).**

#### **V.6.4. Preparação da *Leishmania braziliensis* para infecção**

Foi utilizados parasitos de *L. braziliensis* (MHOM/BR/LTCP11245) caracterizados quanto à espécie pelo método de eletroforese de enzima multicolus. Este isolado foi obtido a partir de uma lesão da pele de um paciente com LC proveniente da região de Corte de Pedra. O isolado 11245 foi retirada do nitrogênio líquido e após o descongelamento foi transferida para o meio Schneider, e mantida em cultura em estufa de 24°C. Durante sete dias o ciclo da cepa foi acompanhado realizando a contagem de promastigotas viáveis com o intuito de avaliar os diferentes estágios de crescimento da *L. braziliensis* e a chegada da fase estacionária do parasito. Para a infecção das células os

parasitos foram contados em câmara de Neubauer, ajustados a uma proporção de  $5 \times 10^6$  parasitos por  $1 \times 10^6$  células.

A infecção de monócitos foi realizada pós a opsonização de promastigotas, onde foi utilizado 5% de soro autólogo fresco por uma hora nas culturas à temperatura ambiente. Para a avaliação da produção de radicais oxidativos por monócitos, foi utilizado o tempo de 25 minutos de infecção. Para avaliar a carga parasitária após a inibição das vias de produção do óxido nítrico e das espécies reativas de oxigênio, foram utilizados os tempos de infecção de 2, 24, 48 e 72 horas. O PMA (Phorbol myristate acetate, Sigma-Aldrich) na concentração de 10 ng/mL foi utilizado como controle positivo dos experimentos.

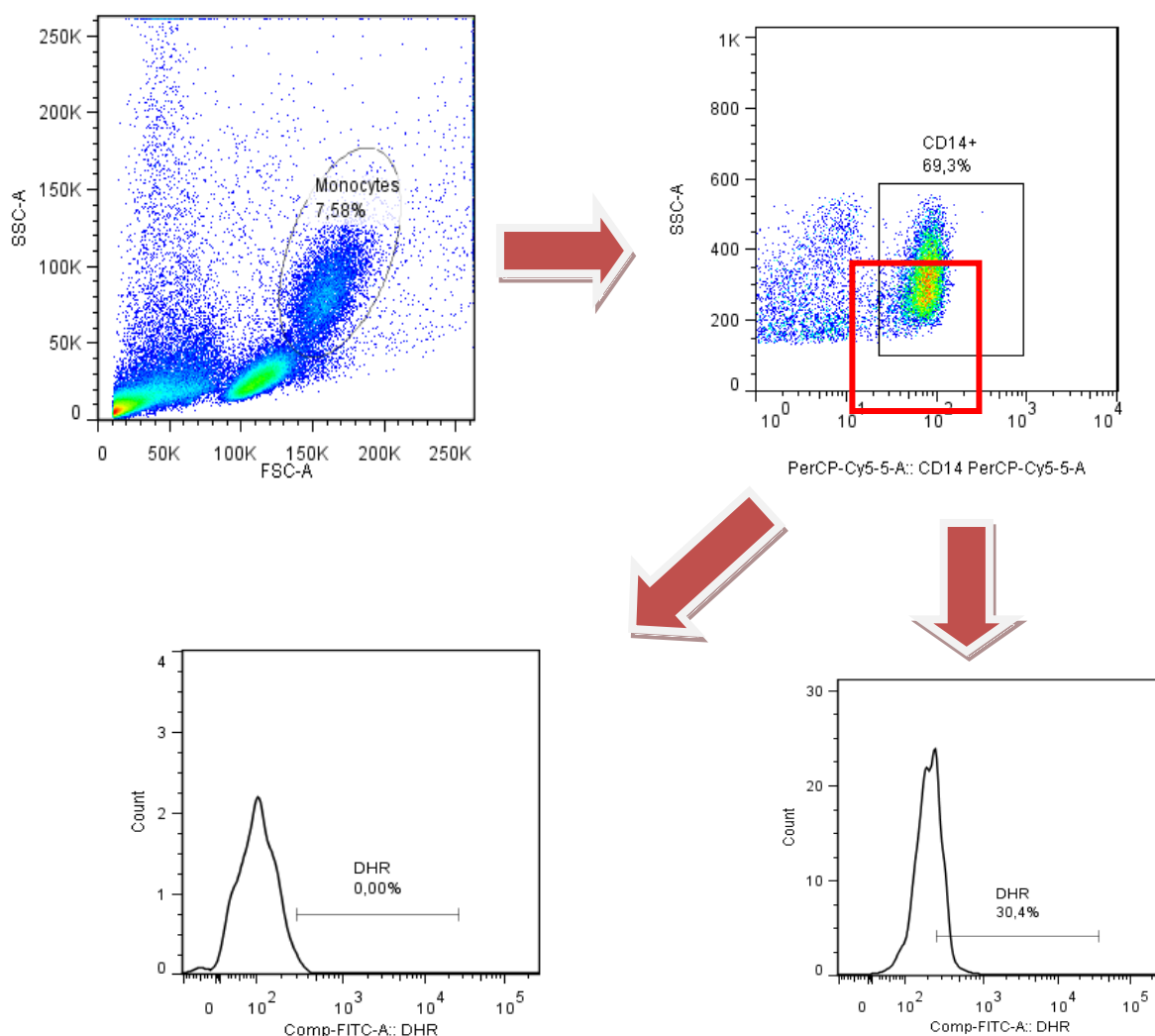
Para avaliar o número de células infectadas e o número de parasitas intracelulares, foi adotada a técnica de citocentrifugação (citospyn), onde foram quantificados as células infectadas, não infectadas e o número de amastigotas através da microscopia óptica.

#### **V.6.5. Inibição da NADPH oxidase e do Óxido Nítrico Sintetase (iNOS)**

Para a inibição das vias de produção das Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), foi utilizado 10  $\mu$ M do inibidor da via da enzima NADPH oxidase, Diphenyleneiodonium chloride (DPI), da SIGMA-ALDRICH. A inibição da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS), foi realizada através do inibidor NG-Methyl-L-arginine acetate salt (L-NMMA) da SIGMA-ALDRICH sendo adicionadas 1 mM nas culturas de monócitos. As culturas de célula foram estimuladas por 10 minutos com os respectivos inibidores à 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>.

### V.6.6. Avaliação do burst oxidativo em monócitos

Para a avaliação da produção de radicais oxidantes através da citometria de fluxo, foi adicionado nas culturas de monócitos o marcador cromógeno de burst oxidativo, dihydrorhodamine 123, o DHR, (CAYMAN CHEMICAL COMPANY) na concentração de 10 ng/mL por 20 minutos. Em seguida foi realizada a infecção dos monócitos com *L. braziliensis* após opsonização com soro autólogo na proporção de 5 parasitos:1 monócito. A representação gráfica da estratégia utilizada para a separação das células CD14+ e da produção do burst oxidativo está demonstrada na figura 5.

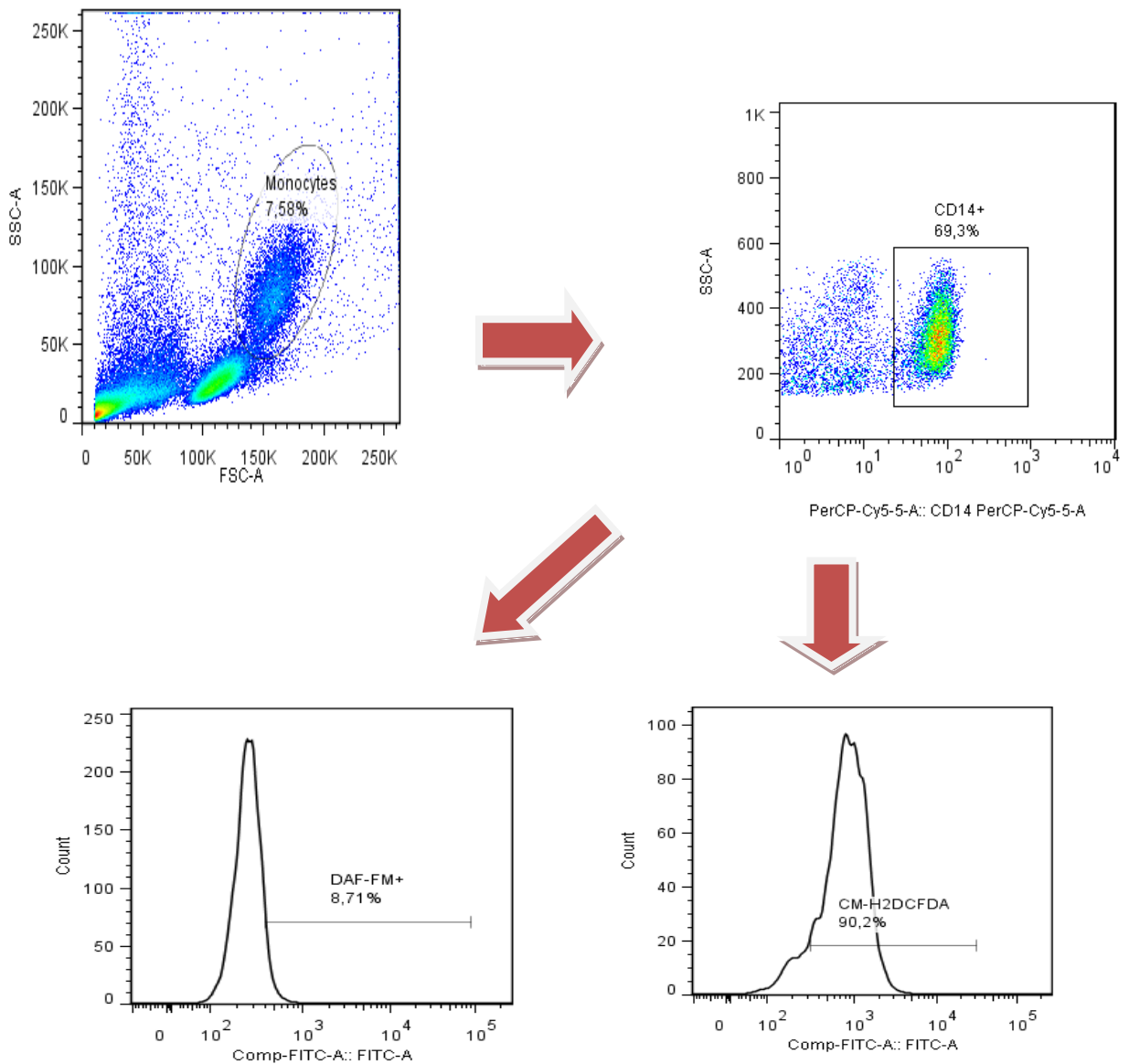


**Figura 5: Representação gráfica da produção de burst oxidativo por monócitos a partir da separação das CMSPs** utilizando marcação da população com anticorpos monoclonais anti-CD14 (PerCP-Cy5.5) e anti-CD16 (PE). Foram selecionadas as células CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> e a produção do burst oxidativo foi detectado através do DHR+ (FITC).

#### **V.6.7. Avaliação da produção intracelular de óxido nítrico e das espécies reativas de oxigênio em monócitos**

Para a avaliação da produção de óxido nítrico por monócitos, foi utilizada uma sonda intracelular fluorescente específica, o DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (Molecular Probe, Life Technologies). A sonda foi adicionada nas culturas de monócitos na concentração de 10 µM. Após o estímulo com a sonda foi realizada a infecção dos monócitos por *L.braziliensis* na proporção de 5:1 por 25 minutos e a produção de óxido nítrico foi determinada pela técnica de citometria de fluxo.

A determinação da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) foi realizada através de sonda intracelular fluorescente, o CM-H<sub>2</sub>DCFDA (carboxymethyl-H<sub>2</sub>-dichlorofluorescein diacetate (Molecular Probe, Life Technologies). A sonda foi adicionada nas culturas de monócitos na concentração de 1µM. Após o estímulo com a sonda as células foram infectadas por *L. braziliensis* na proporção de 5:1 e a produção de ROS foi determinada pela técnica de citometria de fluxo. A representação gráfica da estratégia utilizada para a separação das células CD14<sup>+</sup> e da produção do NO e ROS está demonstrada na figura 6.



**Figura 6: Representação gráfica da produção intracelular do NO e do ROS por monócitos a partir da separação das CMSPs utilizando marcação da população com anticorpos monoclonais anti-CD14 (PerCP-Cy5.5), foram selecionados os monócitos CD14+ e a produção do NO e do ROS foi detectado através das sondas DAF-FM diacetato e CMH- H<sub>2</sub>DCFDA respectivamente.**

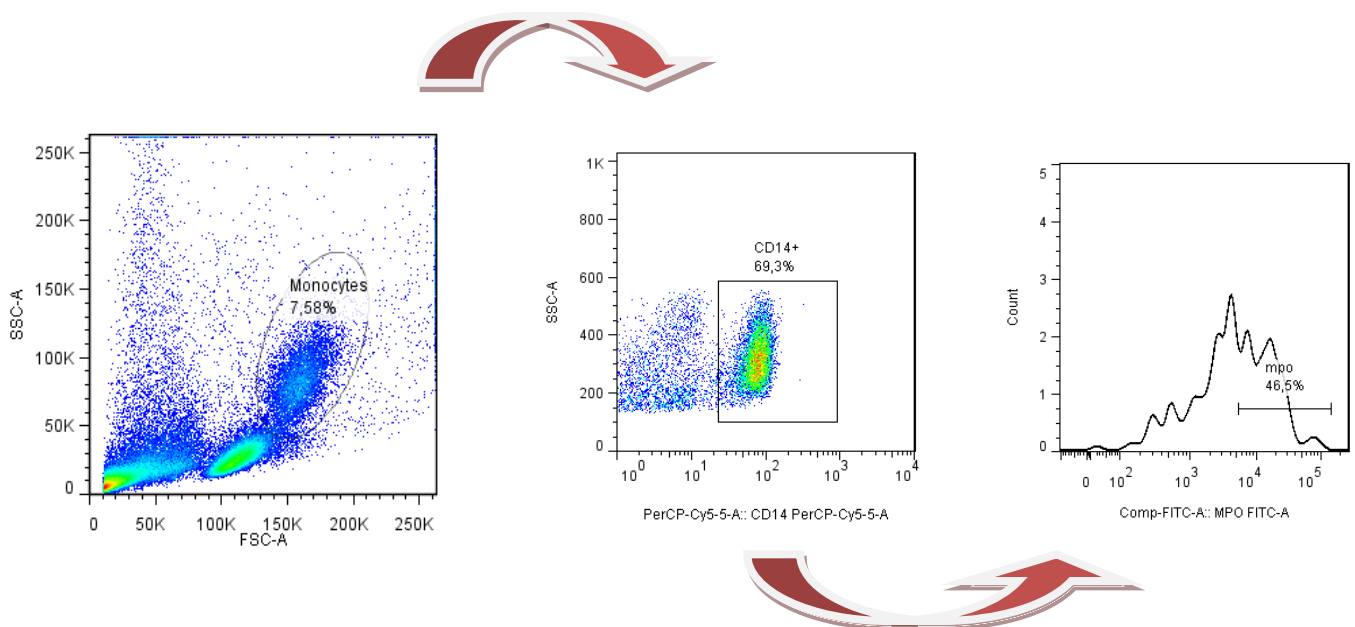
#### **V.6.8. Viabilidade de promastigotas**

Os monócitos obtidos das CMSP foram tratados com os inibidores das enzimas NADPH oxidase (DPI) e óxido nítrico sintetase (L-NMMA). Posteriormente, foram infectados com *L. braziliensis* na proporção de 5:1 por 2 horas. Após a infecção as culturas foram centrifugadas por duas vezes com solução salina estéril a 0,9% (a 1000 rpm por 10 minutos) para a remoção dos parasitas não internalizados pelos monócitos. Após a última centrifugação, as células foram ressuspensas com meio de cultura para *Leishmania*, Schneider, e cultivadas por 2, 24, 48 e 72 horas a 24°C. A quantificação das promastigotas viáveis foi feita através da técnica de microscopia óptica em câmara de Neubauer (Novais *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2013).

#### **V.6.9. Produção de Mieloperoxidase (MPO)**

Para a determinação da produção da MPO, foi realizada cultura de células na concentração de  $1 \times 10^6$ , e os monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> foram infectados por *L. braziliensis* na proporção de 5:1 nos períodos de 20 minutos, 2, 10 e 24 horas. Em seguida foi adicionado Stop Golgi, que tem a função de inibir o transporte de proteínas a partir do retículo endoplasmático para complexo de Golgi (protocolo-BD Cytotfix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit (BD GolgiPlug™555028)). Estas células foram centrifugadas e marcadas com anticorpo monoclonal anti-CD14 (PerCP-Cy 5.5). As células foram incubadas durante 15', depois lavadas com PBS 1X e fixadas com paraformaldeído a 2%. Depois de 24 horas foram lavadas com PBS 1x e ressuspensas em solução BD Perm/Wash durante 15 minutos,

novamente centrifugadas por 5' e marcadas com anticorpo monoclonal anti-MPO (FITC) no período de 30' a 4°C. Para análises dos dados em citometria de fluxo, a região de monócitos foi delimitada levando em consideração os parâmetros tamanho (SSC) e granulidade (FSC). Como controle foi utilizado o PMA (Phorbol myristate acetate, Sigma-Aldrich) na concentração de 10 ng/mL. A figura apresenta a estratégia utilizada para avaliação da expressão de MPO por monócitos infectados por *L.braziliensis*.



**Figura 7: Representação gráfica da produção de MPO por monócitos a partir da separação das CMSPs** utilizando marcação da população com anticorpos monoclonais anti-CD14 (PerCP-Cy5.5), foram selecionadas os monócitos e a produção da MPO foi realizada utilizando anticorpo anti-MPO através de marcação intracelular.



#### **V.6.10. Análise de dados**

Para todas as avaliações realizadas através da citometria de fluxo foi utilizado o citômetro de fluxo localizado no laboratório da área endêmica de Corte de Pedra, BD FACSVerser<sup>TM</sup>. Entretanto, também foi utilizado o aparelho de citometria de fluxo BD FACSCanto<sup>TM</sup>II, localizado no Serviço de Imunologia, do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (Com-HUPES).

Os dados de Citometria de fluxo foram analisados através do software FlowJo (GeneChip<sup>®</sup> da empresa Affymetrix<sup>®</sup> versão 7.6.5) e para análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software, San Diego, CA, USA). A distribuição das amostras foi determinada através do teste de normalidade de D'Agostino-Pearson e a escolha dos testes foi de acordo com a distribuição apresentada para cada amostra. Para as amostras com distribuição não-paramétrica, as análises entre grupos de participantes do estudo foram feitas através do teste U de Mann-Whitney, a comparação estatística entre condições diferentes no mesmo indivíduo foi realizada por teste T de Willcoxon e a comparação entre três ou mais grupos foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis. O ponto de corte para significância estatística foi estabelecido valor de  $p < 0,05$ .

#### **V.6.11. Considerações éticas**

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, parecer nº 25/2012. Todos os pacientes, indivíduos SC e controles sadios que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este trabalho possui financiamento do NIH (National Institute of Health- EUA), NIH-AI30639 e AI088650.

**ARTIGO**

“The role of Nitric Oxide and ROS in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis”. (artigo a ser submetido Infection and Immunity. *vide* Normas de publicação **ANEXO IV**).

## **VI. ARTIGO**

### **The role of nitric oxide and ROS in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis**

Pedro Paulo Carneiro<sup>a#</sup>, Jacilara Conceição<sup>a</sup>, Michael Macedo<sup>a</sup>, Aline Muniz<sup>a</sup>, Edgar M. Carvalho<sup>ab</sup>, Olívia Bacellar<sup>ab\*</sup>

Serviço de Imunologia, Universidade Federal da Bahia (UFBA)<sup>a</sup>; INCT-DT (National Institute of Science and Technology-Tropical Diseases)<sup>b</sup>

#Address correspondence to pedropcarneiro@ig.com.br.

\*Present address: Olívia Bacellar, PhD, rua João das Botas s/n, 5º andar, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Serviço de Imunologia, Salvador-BA-Brasil. Email: olivinhaufba@gmail.com

*[Authors of submissions to JVI, mBio, or MCB should also supply word counts for the abstract and text (JVI and mBio) or for Materials and Methods and the rest of the text (MCB).]*

**Introduction:** In cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*, pathogenesis is associated with an exaggerated Th1 response that is not appropriately modulated. Monocytes/macrophages are the main cells that harbor *Leishmania*, and their activation depends mainly on the production of IFN- $\gamma$  by T and NK cells, which brings about cellular processes such as the generation of an oxidative burst. The reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO), which are produced in response to phagocytosis and after activation of these cells, respectively. In a murine model of infection, the production of NO by macrophages has been shown to be involved in *Leishmania* death. However, the mechanisms used by these cells in humans are not yet well established. **Objective:** To evaluate the role of NO and ROS in controlling *L. braziliensis* infection by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis (CL) and subclinical individuals (SC). **Methods:** Monocytes from patients with CL (n = 25) and from subclinical individuals (n = 09) were infected with *L. braziliensis* at 5:1 ratio and evaluated after different periods of time. The determination of the production of oxidative radicals by flow cytometry was performed by oxidation of Dihidrorodamina 123 (DHR -123) after the inhibition of NO production (L- NMMA- inhibitor of nitric oxide synthetase) and after the inhibition of ROS production (DPI -inhibitor of NADPH oxidase enzyme). The intracellular production of NO and ROS was determined by using specific intracellular probes (DAF - FM diacetate and 2DCFDA HCM) with flow cytometry. To evaluate the effects of oxidants in the control of infection within monocytes, optical microscopy was used to determine the number of infected cells and the number of amastigotes. **Results:** After *L. braziliensis* infection, the expression of the oxidative burst by monocytes from patients with CL was higher when compared to SC individuals and healthy controls. After the inhibition of NADPH oxidase, a significant decrease in expression of the oxidative burst by monocytes from CL patients was observed, suggesting that there is higher ROS production by these cells. The evaluation of the intracellular production of these oxidants shows that the production of ROS is higher than the NO production in patients with CL. The production of NO was higher in CL patients compared with the production in cells of SC individuals, and ROS production was also higher in patients with LC, but without significant differences. NO production was significantly correlated with the size of the lesions in patients with CL. After 72 hours of infection, the number of infected cells and the parasite load were significantly decreased in the cell cultures where NADPH oxidase was inhibited. These results were associated with the viability of the promastigotes at the same time and under the same conditions. **Conclusions:** These results suggest that the production of ROS is important in the control of *L.braziliensis* infection by monocytes from patients with CL while the production of NO seems to be more related to lesion development in these patients. Regarding subclinical individuals, there is no indication that these molecules are involved in infection control. **Keywords:** *Leishmania braziliensis*; Cutaneous Leishmaniasis; nitric oxide; reactive oxygen species.

## **Introduction:**

Leishmaniasis is a set of vector - dependent parasitic diseases whose etiologic agent is the protozoan *Leishmania* ( family Trypanosomatidae ) . Infection with *Leishmania* spp. results in a broad clinical spectrum, which can be classified in two main forms: cutaneous leishmaniasis (CL) and visceral leishmaniasis (VL) . Among the manifestations of cutaneous leishmaniasis observe the cutaneous (CL) , mucosal ( ML ) , disseminated ( DL ) and diffuse cutaneous (CDL ) . The clinical forms of the disease are related to the infecting *Leishmania* species , the geographic region and the factors of the host immune response .

In the Americas , currently 11 species of *Leishmania* causing human cutaneous disease are recognized . In Brazil , the main species are: *Leishmania braziliensis* , *Leishmania guyanensis* and *Leishmania amazonensis* ( Ministério da Saúde, 2009) .

In different clinical manifestations of the disease , when penetrating the host *Leishmania* interacts with deferent cell types of the innate immune response , including neutrophils , macrophages and dendritic cells . Dendritic cells play an important role in resistance to infection by *Leishmania* antigen, activation of Th1 cells and producing IL - 12 ( Lemos, 2004; Von Stebut , 1998). Macrophages are importants cells harboring the parasite and hence its survival or death depends on the activation of these cells . Macrophage activation, consists in increased expression of HLA- DR and co-stimulatory molecules , the production of proinflammatory cytokines, chemokines (IL - 12 and TNF) , nitric oxide (NO) and . The production of IFN -  $\gamma$  by NK cells and T cells is considered the main mechanism of activation of macrophages to kill *Leishmania* .

Some cellular processes are initiated after activation of macrophages , including fagolisosomal production of degradative enzymes such as proteases , nucleases , phosphatases , lipases , esterases , and the generation of oxidative reactions ( Liew , 1990) . Two important molecules are critical in controlling *Leishmania* infection are superoxide anion (  $O_2^-$  ) and nitric oxide ( NO) . During the initial phase of infection by *Leishmania*, superoxide is produced as part of the oxidative burst of macrophages in response to phagocytosis ( Channon et al , 1984; . Miao and Clair, 2009) . The second oxidant produced by macrophages is nitric oxide, which in contrast to superoxide , is generated after activation of macrophages by IFN -  $\gamma$  and TNF -  $\alpha$  ( Evans et al , 1984; . Gantt et al , 2001. ) .

The mechanisms used by human macrophages to kill *Leishmania* are not yet well established. While in mice, a major role of NO in the death of the parasite in humans has been observed to process participation of this molecule is still questionable ( Assreuy et al, 1994; . Evans et al, 1993; . Miao et al, 2009 ). . Based on studies evaluating the role of oxidant molecules in different species of *Leishmania* and the paucity of studies in humans, our study aims to evaluate the role of nitric oxide and reactive oxygen species ( ROS ) in the control of infection by *L. braziliensis* in monocytes from cutaneous leishmaniasis patients.

### **Subjects and Methods**

For this study, 25 patients with CL, were admitted to the Healthy Post of Corte de Pedra, municipality of Tancredo Neves, Bahia, Brazil, a well known area of *L. braziliensis* transmission. Patients were diagnosis based on the presence of typical CL ulcers and parasites were identified in by culture or histopathology or by the presence of parasite DNA by polymerase chain reaction (PCR). The majority of patients had 1 ulcers, with a duration of illness ranging from 30 to 60 days, and were evaluated prior to therapy. A Subclinical group (SC), was formed by 9 individuals. Were defined as individuals without history of any type of leishmania infection who were living in the same home as the index case at the time of enrollment in the study and at the time of diagnosis of CL by the index case (Schnorr, 2012). A control group was formed by 10 healthy subjects (HS) living in an area of no exposure to leishmania. The study was approved by the ethical committee of the Hospital Universitário Professor Edgard Santos and all subjects signed an informed consent.

### ***Cell Separation***

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by density gradient centrifugation using lymphocyte separation medium\_ Ficoll Hypaque (LSN; Organon, Durham, NC ). Cells were then washed in saline and resuspended in RPMI 1640 (supplemented with 5% of fetal calf serum, 100 U penicillin/mL, 100ug streptomycin/ mL) ( GIBCO BRL., Grand Island, NY , USA).

### **Parasite**

An isolate of leishmania obtained from a skin lesion of a CL patient from Corte de Pedra (MHOM/BR/LTCP11245) was characterized as *L. braziliensis* using PCR and

electrophoresis multicolus enzyme [17] and was initially grown in biphasic medium (NNN). After isolation, the parasite was cryopreserved in liquid nitrogen. Before use, it was grown in Schneider medium (Aldrich Sigma, St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gilco BRL) and 2% sterile urine. For *in vitro* infection of PBMC were used promastigotes in the stationary growth phase.

### **Infection of monocytes with *L. braziliensis***

PBMC ( $1 \times 10^6$  cells / tube) of CL patients, SC individuals and healthy subjects were infected with *L. braziliensis* at a ratio of 5:1 parasites per cell, but after the infection the promastigotes were opsonized in used 5% fresh autologous serum in cultures for 25 minutes at room temperature. and incubated at 37 ° C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After the incubation, extracellular parasites were washed with 0.9% saline containing 10% FBS. The cells were placed in complete RPMI 1640 medium and incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. PMA (Phorbol myristate acetate, Sigma-Aldrich) at a concentration of 10 ng / ml was used as a positive control in the experiments. To evaluate the number of infected cells and the number of intracellular parasites, we adopted the technique of cytospin (citospyn), which were quantitated infected, uninfected cells and the number of amastigotes by optical microscopy.

### **Inhibition of NADPH oxidase and nitric oxide synthase (iNOS)**

For the inhibition of the Reactive Oxygen Species (ROS), were used 10 mM pathway inhibitor of NADPH oxidase, was used Diphenyleneiodonium chloride (DPI), SIGMA-ALDRICH. The inhibition of the nitric oxide synthase (iNOS) was performed using 1 mM for NG-methyl-L-arginine acetate salt (L-NMMA) from SIGMA-ALDRICH in monocyte cultures. Cell cultures were stimulated for 10 minutes with the respective inhibitors at 37 ° C in 5% CO<sub>2</sub>.

### **Evaluation of the oxidative burst and the production of NO and ROS in monocytes**

To evaluate the production of oxygen radicals by flow cytometry, was added to the cultures of monocytes chromogen marker of oxidative burst, dihydrorhodamine 123, DHR (CAYMAN CHEMICAL COMPANY) at a concentration of 10 ng / ml for 20 minutes. After infection of monocytes was done with *L. braziliensis* after opsonization with autologous serum at a ratio of 5:1 parasites per cell.

For the evaluation of nitric oxide production by monocytes, specific intracellular fluorescent probe was used, the DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (Molecular Probe, Life Technologies). A probe was added to the cultures of monocytes at a concentration of 10  $\mu$ M. After challenge infection with the probe *L.braziliensis* monocytes was carried out by 5:1 for 25 minutes and nitric oxide was determined by flow cytometry. Determination of the production of reactive oxygen species (ROS) was performed by intracellular fluorescent probe, CM-H2DCFDA (carboxymethyl-H2-dichlorofluorescein diacetate (Molecular Probe, Life Technologies). A probe was added in cultures of monocytes in the concentration of 1  $\mu$ M.

### **Statistical Analysis**

Statistical analysis by GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) was performed. The comparison between groups (CL patients and SC individuals) was performed using the nonparametric Mann-Whitney. An  $\alpha$  error below 5% ( $p < 0.05$ ) was used for statistical significance.

Analysis of variance (ANOVA), with repeated measures, was calculated to assess the differences between three or more groups, with Bonferroni post-test's when the  $p$  value was  $< 0.05$ .

### **Production of Myeloperoxidase (MPO )**

To determine the production of MPO , cell culture was carried out at a concentration of  $1 \times 10^6$  , and the monocytes were infected with *L. braziliensis* at ratio 5:1 in periods of 20 minutes, 2, 10 and 24 hours. Stop Golgi was added, which has the function of inhibiting the transport of proteins from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex ( protocol -BD Cytofix / Cytoperm Plus <sup>TM</sup> Fixation / Permeabilization Kit ( BD GolgiPlug <sup>TM</sup> 555028 ) . These cells were labeled with anti- CD14 monoclonal antibody ( PerCP , Cy 5.5). cells were incubated for 15 ' , then washed with 1X PBS and fixed with 2% paraformaldehyde. After 24 hours were washed with 1x PBS and resuspended in BD solution Perm / Wash for 15 minutes, again centrifuged for 5 ' and labeled with monoclonal anti- MPO (FITC ) within 30' at 4 ° C. For data analysis in flow cytometry , the region of monocytes was defined taking into consideration the size parameters (SSC ) and granularity (FSC) . Since the control PMA ( Phorbol myristate acetate , Sigma -



Aldrich ) was used at a concentration of 10 ng / ml. figure shows the strategy used for evaluation of MPO expression in monocytes infected by *L.braziliensis* .

## **Results**

### **Evaluation of oxidative burst of subclinical individuals and CL patients by monocytes after infection for *L.braziliensis*.**

We also assessed the expression of the oxidative burst in monocytes of individuals after sub-clinical infection with *L. braziliensis* and compared with the production of oxidants by monocytes of healthy controls and CL patients with (Fig.2).

After infection by *L. braziliensis*, the expression of oxidative burst by monocytes of individuals SC, MFI ( $953 \pm 305\%$ ) proved to be lower than expression by monocytes from CL patients ( $2821 \pm 1040\%$ )  $**P < 0.01$ , suggesting that infection by *L. braziliensis* induces a lower expression of the oxidative burst in cells of SC individuals when compared with cells from CL patients.

### **Evaluation of expression of oxidative burst after inhibition of enzymes NADPH oxidase and iNOS in monocytes from CL patients and subclinical individuals after infection with *L. braziliensis*.**

To differentiate whether the increased oxidative burst was due to induction of NO or ROS after phagocytosis of opsonized parasites , the experiments were performed in the presence of inhibitors of NO pathway and ROS pathway .

After inhibition of the enzyme NADPH oxidase , a significant decrease in the MFI of the oxidative burst by monocytes from CL patients (  $1225 \pm 724$ ) was observed when compared to cells that had no pathways inhibited production of oxidants (  $2821 \pm 1040$  ) as well as with cells in which the enzyme iNOS was inhibited (  $2948 \pm 879$  )  $*** p < 0.001$  ,  $** p < 0.01$  ( figure 3A) .

In the individuals SC cells of represented in Figure , after the inhibition of the NADPH oxidase enzyme , a significant decrease ( $314 \pm 247$ ) the expression of the oxidative burst was observed , compared to cells that were not via inhibition of oxidant production (  $953 \pm 305$ )  $** p < 0.01$  ,  $* p < 0.05$ . However , there was no statistical difference between oxidant production after inhibition of NO pathway in comparison to the inhibition of the ROS .

These results suggest that there is a greater induction of ROS compared with the expression of NO by cells both groups.

### **Intracellular production of ROS and NO from monocytes of CL patients and SC individuals after infection of *L. braziliensis*.**

It has been demonstrated that infection of monocytes from CL patients by *L. braziliensis* induce increased production of ROS compared NO production ( $47 \pm 35\%$  versus  $12 \pm 10\%$ ) \*  $p < 0.05$  (Figure 4A).

To evidence that the production of ROS and NO was being measured specifically inhibiting NADPH oxidase and nitric oxide synthase have been used. As shown in Figure ..., after it was confirmed that inhibition of the production of NO and the ROS significant decrease in NO production ( $12 \pm 3$  versus  $10\% \pm 2\%$ ) and ROS ( $48 \pm 35\%$  versus  $\pm 7.5\%$ ) (\*  $p < 0.05$ ).

When evaluating the specific production of NO and ROS in monocytes of individuals SC after infection by *L. braziliensis*, as shown in figure..., we observed an increased ROS production when compared to NO production ( $22 \pm 4\%$  versus  $17 \pm 2\%$ ) (\*\*  $p < 0.01$ ).

Comparing NO production in CL patients and SC individuals in fig 4B, it was observed that the production of this molecule was higher in CL patients ( $12 \pm 4\%$  versus  $10 \pm 2\%$ ) \* $p < 0.05$ . The ROS production was also higher in CL patients when compared with production in SC individuals (data shown in Figure ...), but was not observed statistically significant difference ( $47 \pm 35\%$  versus  $22 \pm 17\%$ ).

### **Determination infection and load parasite of monocytes from CL patients after infection of *L. braziliensis***

As shown in Figure 5 the periods of 2 , 24 and 48 hours of infection with *L. braziliensis* no statistical difference in the number of infected monocytes without the presence of inhibitors of oxidant production as well as the presence of inhibitors DPI and L - NMMA . However, in the 72 hours infection period , the cells were treated with pathway inhibitor of ROS production , there was a reduction in the number of infected cells ( $41 \pm 16\%$  versus  $18 \pm 5\%$ ) ( \*\*\*  $p < 0.001$ ).

These data suggest that the absence of ROS promotes the parasite replication in monocytes and within 72 hours after infection excess parasites causes cell lysis and there is a decrease of intact cells harboring the parasite.

Regarding the number of amastigotes, shown in Figure 5A no statistically significant variation in periods of 2,24 and 48 hours between the number of parasites in cells undergoing inhibition of the production of oxidants and cells without inhibition. However, within 72 hours of infection the cells were treated with inhibitor via production of ROS, there was a significant decrease in parasite load ( $119 \pm 61\%$  versus  $53 \pm 23\%$ ), \*  $p < 0.05$ . These results are somewhat in agreement with previous results (Figure 5B), suggesting that within 72 hours of infection the number of intracellular parasites may have caused the breakup cells of Leishmania and were released into the extracellular medium.

#### **Determination infection and load parasite of monocytes from SC individuals after infection of *L. braziliensis***

As shown in Figure ..., a significant reduction in the number of infected cells (Figure ...) and the number of intracellular parasites (Figure ...) between the periods of 24, 48 and 72 hours in the absence of inhibitors. The same occurs with macrophages SC individuals who are less infected and control of the infection than macrophages from patients LC (Giudice et al., 2012).

Regarding the number of amastigotes, shown in Figure ... there was no statistically significant variation in parasite load in cells that did not undergo inhibition and in cells that had inhibition of NADPH oxidase and nitric oxide synthase.

These data suggest that the burst oxidative is not crucial in controlling infection of monocytes from SC individuals by *L. braziliensis* and probably other molecules may be responsible for the decrease in parasite load.

#### **The role of ROS and NO in control of infection with *L. braziliensis* in monocytes from CL patients and SC individuals.**

In order to evaluate the role of NO and ROS in infection control in both groups was assessed the viability of the parasites after inhibition of both pathways using the DIP and L- NMMA. In cell culture LC patients via inhibition of ROS significantly

increased the viability of the parasites after 72 hours of culture medium specific to the parasite growth ( Schneider ) compared with the culture of cells where the route was not inhibited ( $21 \pm 8$  vs  $66 \pm 14\%$ ) \*\*\*  $p < .0.001$  . At the same time, the inhibition of the NO had no effect on the viability of parasites ( $21 \pm 8$  % versus  $18 \pm 7\%$ ) ,  $p > 0.05$  . These data again suggest that NO production appears to participate in the control of infection by *L. braziliensis* by monocytes from patients with LC .

Regarding SC cells of individuals , there was no difference in the viability of the parasites when both pathways were inhibited (  $14 \pm 6$  % versus  $21 \pm 6$  % and  $14 \pm 6$  versus  $13 \pm 8$  % ) ,  $p > 0.05$  . Because the cells of the SC seem to control most individuals infection than cells from patients with LC , ( figuras13A and 12A ) inhibition of these pathways did not affect the viability of the parasites . However a significant difference in viability of the parasites was observed when comparing the inhibition of ROS production in monocytes from patients with LC inhibition of ROS production in monocytes of individuals SC ( $66 \pm 14$  % versus  $21 \pm 6\%$ ) \*\* \*  $p < 0.001$  . These data corroborate previous observations that showed that ROS production appears to be important in controlling infection by *L. braziliensis* by monocytes from patients with LC .

### **Correlation between the production of oxidants by monocytes after the infection with *L. braziliensis* and the lesion size of CL patients**

Some literature data have shown that NO production may be involved in some inflammatory diseases ( Vane et al , 1994; . Laroux et al, 2001 ; . Coleman , 2001). Regarding cutaneous leishmaniasis Qadoumi et al. (2002 ) demonstrated that in cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* iNOS expression was correlated with the number of injuries.

In this study, by analyzing the correlation between NO production and size of lesion of patients with LC, a positive correlation was observed between the generation of this molecule and the size of the lesion with  $p = 0.0028$  and  $r = 0.8929$  , ( figure 14A ) . However, no correlation between the production of ROS and size of lesion ,  $p > 0.05$  ,  $r = 0.1190$  (Figure 14B) and between production of MPO and lesion size  $r = 0.3500$   $p = 0.6000$  (Figure was observed 14C ) . These results somehow strengthen our hypothesis that NO production is not important for the control of infection by *L. braziliensis* , and

further , production of this molecule may contribute to the development of ulcer characteristic of cutaneous leishmaniasis .

### **Determination of the production by myeloperoxidase by monocytes of CL patients and SC individuals after infection with *L. braziliensis*.**

Another molecule involved in the killing of intracellular pathogens is the myeloperoxidase ( MPO ) ( Klebanoff et al . , 2013 ) . In visceral leishmaniasis , which is observed a large spread of parasites , the production of MPO is lower in patients with visceral leishmaniasis compared with healthy controls , suggesting that low activity of this enzyme may contribute to the survival of the parasite in macrophages ( Kumar et al , 2002) .

We evaluated the production of MPO release by monocytes from patients with LC and SC individuals after infection by *L. braziliensis* . Monocytes were labeled with anti-CD14 , anti- CD16 expression and production of myeloperoxidase was determined by intracellular staining with the use of anti- MPO antibody and the detection antibody was performed by flow cytometry .

MPO was produced by cells from patients with LC after *Leishmania* infection in all time periods evaluated and no statistical difference was found between the periods . Monocytes SC individuals also produced the enzyme after infection with *Leishmania*, and a statistically significant decrease was observed after 24 hours , \*  $p < 0.05$  (Figure 15)

Comparing the production of MPO between groups after 20 minutes of infection the production of this enzyme was similar between LC and SC patients (  $18 \pm 7$  % versus  $14 \pm 16$  % ) individuals . In the periods of 2, 10 , and 24 hours there was increased production of MPO in monocytes from patients with LC as compared to SC (  $26 \pm 15$  subjects ,  $28 \pm 10$  % ,  $\pm 10$  %  $17 \pm 5$  vs  $6$  % ,  $\pm 4$  4% ,  $3 \pm 4$  ) \*  $p < 0.05$  , \*\*  $p < 0.01$  , \*\*\*  $p < 0.001$  . (Figure 15)

To demonstrate the production of MPO by these cells was used as positive control and PMA was observed a production of this enzyme by cells of patients with LC (  $27 \pm 10$  % ) and SC cells of individuals (  $14 \pm 16$  % )

## Discussion

As already documented that the adaptive immune response through the production of pro-inflammatory cytokines ( IFN -  $\gamma$  and TNF ) by T cells , is involved in strong inflammatory response that is responsible for the development of the lesion in patients with cutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis*. Studies on the role of cells of the innate immune response in controlling infection by *L. braziliensis* have been shown to be of great importance.

Macrophages are the main cells that infected by Leishmania and consequently the survival or death of this parasite depends on the activation of these cells . Macrophage activation is the upregulation of HLA-DR and costimulatory molecules , the production of pro-inflammatory cytokines (IL-12 and TNF-  $\alpha$  ) , superoxide anion ( O<sub>2</sub><sup>-</sup> ) , nitric oxide (NO) and chemokines .

The mechanisms used by human macrophages to kill Leishmania are not yet well established . While in mice, a role of nitric oxide in the killing of Leishmania in humans has been observed process the share of this molecule is still questionable ( Assreuy , 1994; Evans , 1993; Murray, 1992).

In this study , it was shown the role of NO and ROS produced by monocytes in controlling infection by *L. braziliensis*. These data demonstrate that infection by *Leishmania braziliensis* induced oxidative burst in monocytes from cutaneous leishmaniasis patients, and this formation was highest in monocytes from CL patients as compared to production by cells of healthy subjects. Possible explanations for increased oxidative burst in monocytes from CL patients are likely that these cells are expressing more recognition receptors for the parasite. Some data in the literature point to the action of Toll-like receptors as strong inducers of oxidative response in Leishmania. The contacting of the LPG with the Toll-like receptor 4 (TLR 4) stimulate the synthesis of NADPH oxidase and increased production of ROS ( Sasada , 1983, Gill et al , 2010. ) . More recently, Srivastava et al. (2013 ) demonstrated that expression of Toll-like receptor 2 ( TLR2 ) , increased in macrophages of mice infected with *L. major* was associated with increased oxidative response , in particular the recognition of the LPG by TLR 2 , with the activation of MyD88 and increased iNOS expression ( Srivastava et al . , 2013 ) .

Some individuals in the area of transmission of *L. braziliensis* have a delayed type hypersensitivity to Leishmania antigen, but do not develop the disease. PBMC of such individuals produce little IFN- $\gamma$  and TNF compared to CL patients ( Follador et al, 2002; Schnorr et al, 2012. ). So far it is unclear why these SC individuals have the ability to control the infection. Previous studies have shown that macrophages controlled more of these individuals to infection by *L. braziliensis* compared with macrophages from CL patients ( Giudice et al. 2012). Thus, the production was also assessed oxidative burst by monocytes of SC individuals after infection by *L. braziliensis*. Our results showed that the production of the oxidative burst in the cells is reduced compared to the production by cells of CL patients, suggesting that monocytes from individuals not using the SC as the main oxidative burst microbicidal mechanism in the control of infection by *L. braziliensis*.

The role of NO and the ROS in the generation of oxidative burst after Leishmania infection, the effect of inhibiting the enzymes NADPH oxidase and nitric oxide synthase in the generation of oxidative burst in monocytes from CL patients and subclinical individuals was evaluated. It was observed that after inhibition of NADPH oxidase there was a significant decrease in both induction of oxidative burst in cells of CL patients as SC individuals, suggesting that more ROS being produced during the oxidative response against *L. braziliensis*. The nitric oxide synthase inhibitor (L-NMMA) demonstrated no change in oxidative burst production, suggesting a low NO production by monocytes from CL patients and SC individuals. These results are consistent with a study by Chang et al. (2007), who noted that the production of the oxidative burst in human monocytes after infection by *L. chagasi* remained unchanged after inhibition of iNOS, suggesting that oxidative burst reflected more ROS production. Gantt et al., (2001) showed that there was no difference in survival of *L. chagasi* in murine macrophages, was added as inhibitor of iNOS (L-NMMA) with an increase in the parasite load 48 hours following infection, suggesting that NO is important in controlling infection in murine cells. However, the same was not observed in human macrophages, these cells demonstrating NO appears not to participate in the control of infection by *L. chagasi*.

To confirm whether ROS production would be higher compared to production in CL patients and SC individuals , we employ the use of specific probes for intracellular ROS ( CMH- 2DCFDA ) and NO ( FM diacetate DAF ) , as described in other models of infections and non-infectious pathologies ( Zhang et al , 2013; . Metto et al , 2013; . Mesquita et al , 2013; . Barrera et al , 2013. ) . The results confirmed that the production of ROS is higher than the NO production after infection with *L. braziliensis* in both groups (CL patients and SC individuals ) .

To evaluate the role of these molecules in controlling infection by *L. braziliensis* observed the effect of inhibiting these molecules in the number of infected cells and the number of intracellular parasites in CL patients . It was evident that in periods of 2 , 24 and 48 hours of infection did not change the number of infected cells and the parasite load when 2 way responsible for the production of NO and ROS were inhibited or not . However , after 72 hours of infection , a significant decrease in the number of infected cells and the number of amastigotes after treatment with inhibitors of NADPH oxidase . Our data suggest that NO does not seem to have an effector role in controlling infection by *L. braziliensis* , while the absence of ROS favored the replication of the parasite and rupture the cells, thereby decreasing the number of infected cells and the parasite load .

Some literature data have shown that the production of ROS is related to the control of infection by intracellular pathogens. In an animal model of infection with *Trypanosoma cruzi* , the increased production of ROS by macrophages was associated with decreased parasite load ( Gupta et al . , 2011) . However , more recently it was shown that animals deficient NADPH oxidase infected with *T. cruzi* had a lower survival although they presented the same parasite burden than wildlife . This observation was associated with increased serum levels of nitrite and nitrate, suggesting that both oxidants are important in the control of *T. cruzi* infection ( Santiago et al . , 2012) . The infection of human macrophages with *Toxoplasma gondii* has been documented that increased production of ROS played an important role in the elimination of parasites ( Shrestha et al . , 2006) . In experimental leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis* documented the involvement of ROS as leishmanicidal substance ( Degrossoli et al , 2011; . Fonseca - Silva , 2013 ) .

For SC individuals there was a significant decrease in the number of infected cells and the number of amastigotes between different time periods in the absence of inhibitors .



These results confirm previous observations where macrophages infected SC individuals are less and control of the infection than macrophages from CL patients. ( Giudice et al . , 2012) . These data suggest that the burst oxidativo seems to be crucial in controlling infection of monocytes from SC individuals by *L. braziliensis* and other molecules can probably be accounted for reduced parasitic burden in these individuals .

To confirm our findings that 72 hours after infection in the absence of CL patients from ROS production in monocytes favored generated parasite replication and lysis of the cell, test the viability of parasites , consisting in quantifying viable promastigotes was carried out in culture media after infection by Leishmania cells in the presence or absence of inhibitors . The increase in the number of viable promastigotes after 72 hours of infection in monocytes treated with inhibitor of ROS production pathway suggests that production of this molecule can participate in controlling infection . However cells of SC individuals, inhibition of the way did not affect the survival of promastigotes , suggesting that this group of individuals resistance to infection is related to other mechanisms.

The results found in this study suggest that the production of NO in cutaneous leishmaniasis seems not participate in the control of infection by *L. braziliensis* . However, some studies with other models of infection has correlated with increased expression of iNOS by tissue injury in some pathologies such as tuberculoid leprosy , borderline leprosy and psoriasis type 1 ( Kröncke et al , 1998; . Little et al, 2001 ; Khanolkar -Young et al , 1998). By analyzing the intracellular NO production and lesion size from CL patients is a strong positive correlation between these parameters was found . However the same was not observed with intracellular ROS production and the size of the lesion in these patients . These data support us to suggest that NO does not participate in infection control as it seems to participate in the development of tissue injury observed in these patients . Had already been described in the literature in american cutaneous leishmaniasis ( caused by *L. mexicana* ) was a strong correlation between the expression of iNOS and the number of skin lesions . ( Qadoumi et al. 2002). Other studies have demonstrated that certain cytokines , especially IFN-  $\gamma$ , stimulate the production of iNOS ( Murray et al. , 2011) . The expression of this enzyme has also been documented in lesions of CL patients. ( Qadoumi et al , 2002; . Arevalo et al , 2002; . Díaz et al , 2005; . Morgado et al , 2008. ) . Since patients with LC have a high production of IFN -  $\gamma$  in peripheral blood and tissue ( Bacellar et al , 2002; . Faria

et al , 2005) , this cytokine was stimulating NO production which consequently also contribute to the development the cutaneous lesions observed in this patient .

Other molecules can be associated with the control of the parasitic load and myeloperoxidase , which catalyzes reaction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with a chloride ion to yield hypochlorous acid that is used to kill parasites by phagocytic cells. Despite the important role of MPO in host defense , its deficiency is common in healthy individuals ( Kumar et al . , 2002) . Little is known about the role of this enzyme in the control of Leishmania infection . It was recently demonstrated in human visceral leishmaniasis serum that production of MPO was higher in patients as compared with that in healthy controls ( Elshafie et al. , 2011) . These data demonstrate that production of MPO in monocytes from CL patients is increased during the first hours of infection in SC individuals however there was a low yield of MPO in the cells compared to monocytes from CL patients. The increase in MPO in CL patients probably reflects the increased production of ROS in particular the activity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by these cells and high activity of NADPH oxidase inhibitors ( Kumar et al. 2002). Other studies should be conducted to clarify the role of this enzyme in controlling infection by *L. braziliensis* .

Recently, it has been shown that peroxynitrite ( ONOO<sup>-</sup> ) , appears to have a greater cytotoxic effect on intracellular pathogens . In infections with *Trypanosoma cruzi* , was presented a highly toxic ONOO<sup>-</sup> produced by the phagosome of macrophages with the parasite , suggesting that this molecule could potentially eliminate the pathogen ( Alvarez et al . , 2010) . In studies with *Leishmania amazonensis* , it has been shown that the formation of ONOO<sup>-</sup> in has a greater effect amastigotes compared to the production of NO (Linares et al , 2000; . Van Assche et al , 2011. ) .

The observations in this study suggest that ROS production appears to be related to the control of infection with *L. braziliensis* by monocytes from CL patients as NO production appears to be more involved in the development of the lesion. Regarding subclinical individuals there is not indication that these molecules are involved in infection control and other studies are needed to evaluate other mechanisms that could be related to protecting these individuals.

Figure 2: Expression of oxidative burst after infection with *L. braziliensis* in monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis, subclinical individuals and healthy controls.

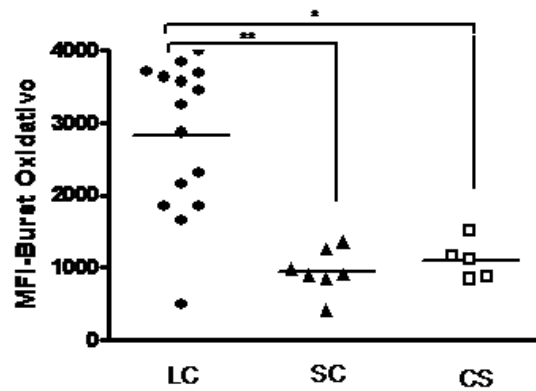


Figure 3: Expression of the oxidative burst by monocytes from CL patients and SC individuals after inhibition of NADPH oxidase and iNOS.

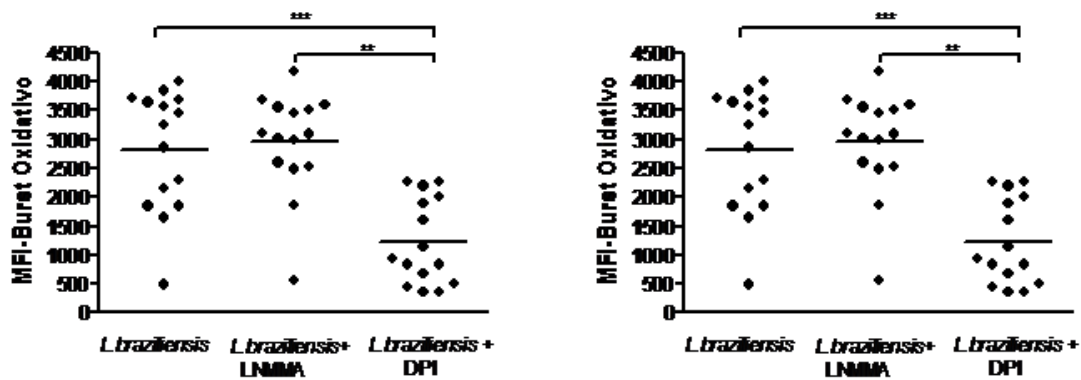
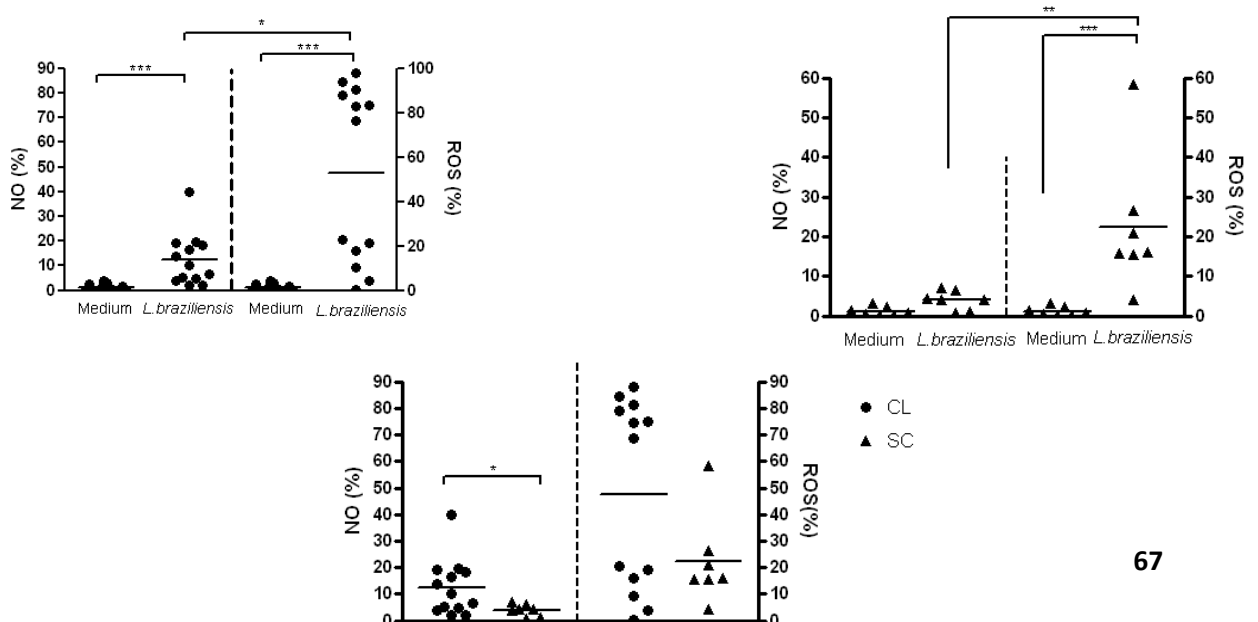
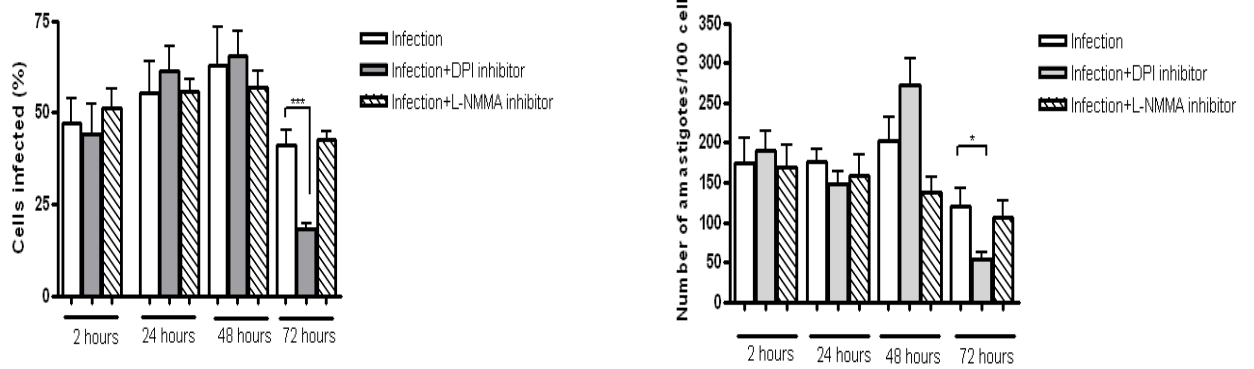


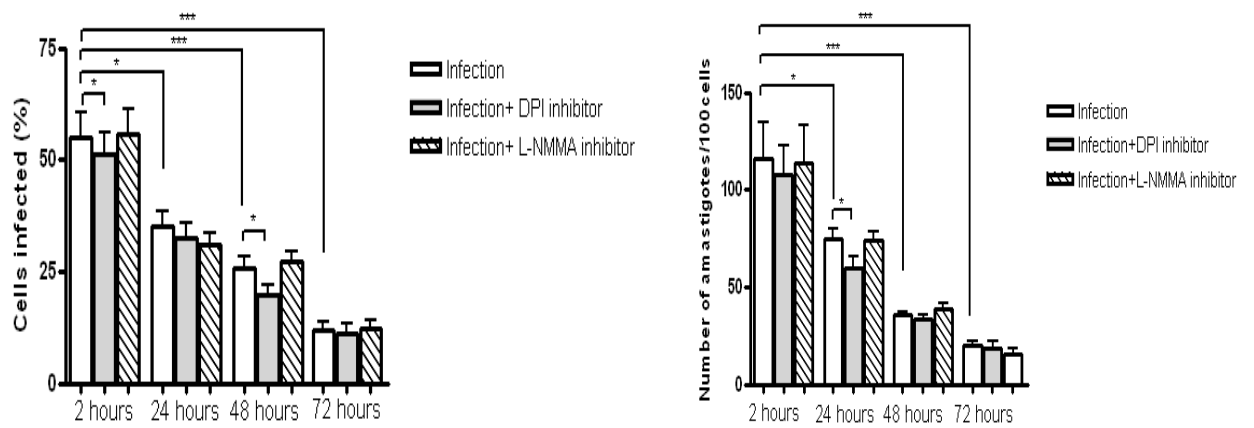
Figure 4: Comparison of NO and ROS production from monocytes of SC individuals and CL patients after infection by *L. braziliensis*



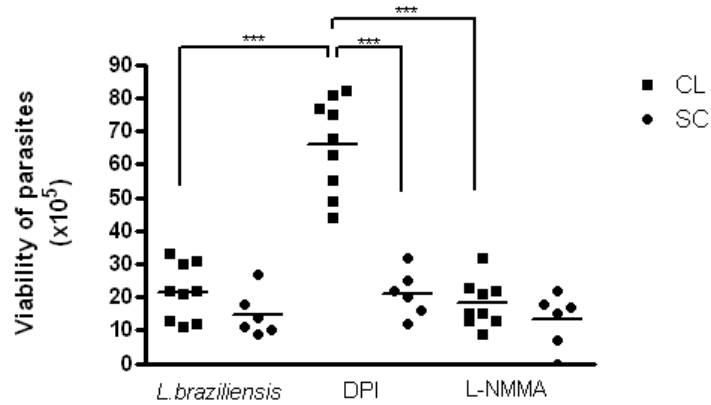
**Figure 5: Evaluation of infection and parasite load of monocytes from CL patients after infection by *L.braziliensis*:**



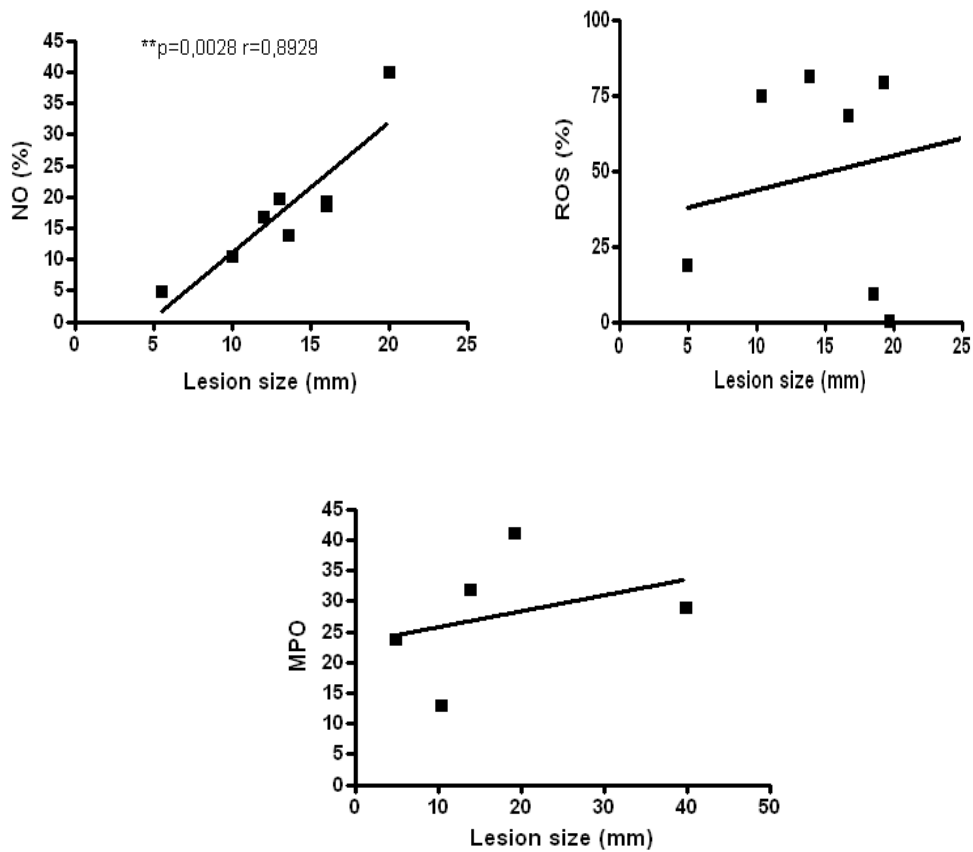
**Figure 6: Evaluation of infection and parasite load of monocytes from SC individuals after infection by *L. braziliensis* in the presence of inhibitors of NO and the ROS.**



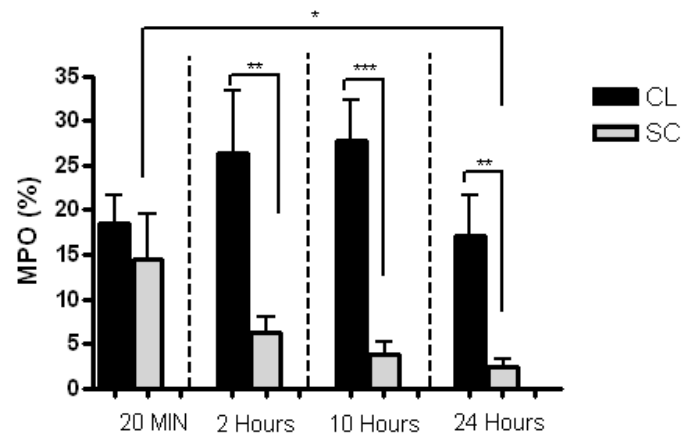
**Figure 7: Assessment of the viability of promastigotes of *L. braziliensis* after inhibition of NADPH oxidase and iNOS in monocytes from CL patients and subclinical individuals**



**Figure 8: Correlation between production of NO and the ROS production by monocytes following infection with *L. braziliensis* and lesion size in CL patients.**



**Figure 9: Determination of the production of MPO in monocytes from patients CL and SC individuals.**



## VII. RESULTADOS

### VII.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Foram avaliados 25 pacientes com leishmaniose cutânea, 9 indivíduos subclínicos residentes na região endêmica de Corte de Pedra, e 10 indivíduos saudáveis, não residentes da área endêmica. Os dados epidemiológicos e clínicos da população estudada estão resumidos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Aspectos epidemiológicos e clínicos dos pacientes com leishmaniose cutânea, indivíduos subclínicos e controles saudáveis.

	<i>Pacientes LC</i>	<i>Indivíduos SC</i>	<i>Controles Saudáveis</i>
Número	25	9	10
Idade (anos)	30.5 (53-17)	21(31-14)	30.3 (53-24)
Gênero	19 M; 6 F	6 M; 3 F	2 M; 8 F
Tamanho da lesão (média mm)	14.8x13.3	-	-

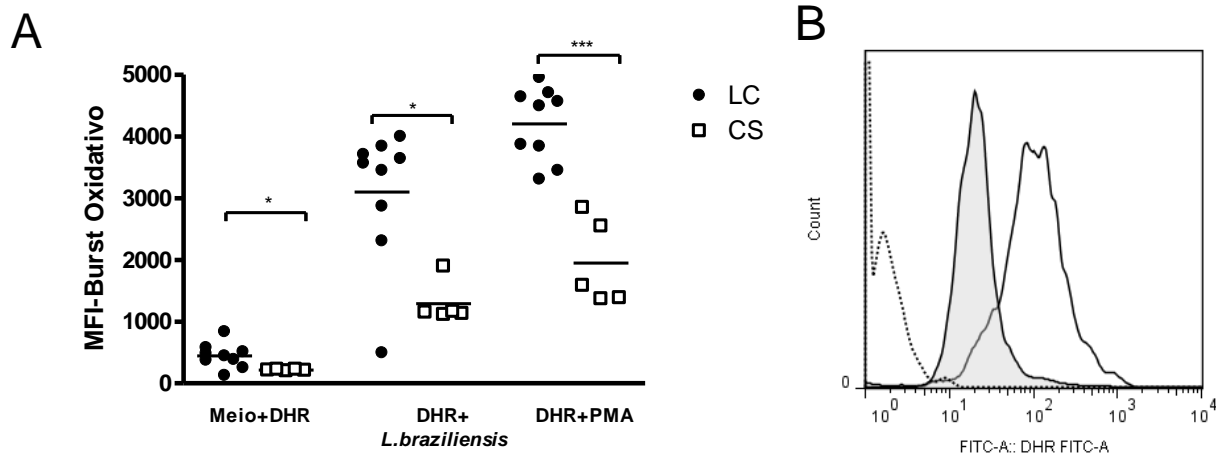
## VII.2 AVALIAÇÃO DO BURST OXIDATIVO POR MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA APÓS INFECÇÃO POR *L. braziliensis*

Os monócitos do sangue de pacientes com LC e controles sadios foram marcados com anticorpos anti-CD14 e a expressão do burst oxidativo após a infecção por *L. braziliensis* foi avaliada com o marcador Dihidrorodamina 123 (DHR) através da técnica de citometria de fluxo.

Inicialmente, os monócitos foram avaliados de acordo com tamanho (FSC-H) e granulosidade (SSC-H), como pode ser observado na figura 1 em material e métodos. Para confirmar o isolamento da população de monócitos, estes foram identificados de acordo com a marcação dos anticorpos anti-CD14.

A Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) do burst oxidativo por monócitos de pacientes com LC ( $3096 \pm 1109$ ) demonstrou ser maior que o observado nos controles sadios ( $1291 \pm 339.3$ ),  $***p < 0.001$ ,  $*p < 0.05$ , após a infecção por *Leishmania* (figura 8A). Nossos dados sugerem que a *L. braziliensis* induz maior expressão de burst oxidativo em monócitos de pacientes com LC. Foi utilizado como controle positivo dos experimentos o estímulo com PMA.



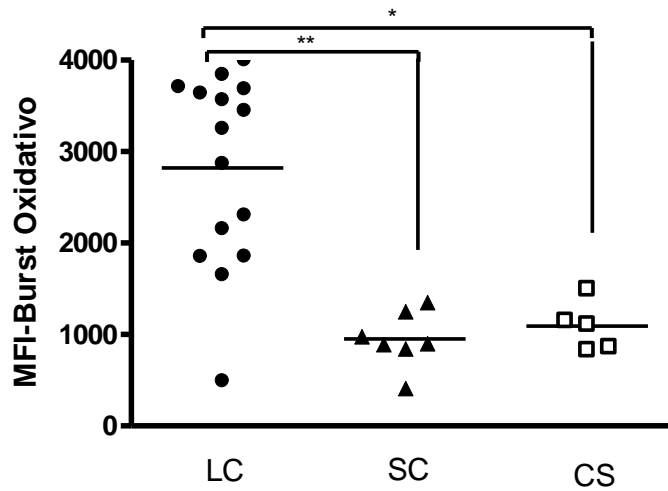


**Figura 8: Expressão do burst oxidativo por monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea e controles saudios:** Monócitos do sangue periférico de pacientes com LC (n=09) e controles saudios (n=05) foram marcados com anti-CD14, anti-CD16. O DHR foi utilizado para avaliar a expressão do burst oxidativo (figura A) pelos monócitos após a infecção por *L. braziliensis* através da técnica de citometria de fluxo. O histograma representativo da análise por citometria está demonstrada na figura B. Os resultados estão expressos em MFI e todos os valores foram representados em média e desvio padrão onde os valores de  $p$  foram obtidos através do teste de Mann Whitney ( $*p<0.05$ ).

### VII.3 AVALIAÇÃO DO BURST OXIDATIVO POR MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS SUBCLÍNICOS APÓS INFECÇÃO POR *L.braziliensis*.

Foi avaliada também a expressão do burst oxidativo em monócitos de indivíduos subclínicos após a infecção por *L. braziliensis* e comparado com a produção dos oxidantes por monócitos de controles sadios e pacientes com LC (figura 9).

Após a infecção por *L. braziliensis*, a expressão do burst oxidativo pelo MFI dos monócitos de indivíduos SC ( $953\pm 305\%$ ) demonstrou ser menor que a expressão por monócitos de pacientes com LC ( $2821\pm 1040\%$ )  $**p<0.01$ , sugerindo que a infecção por *L. braziliensis* induz uma menor expressão do burst oxidativo em células de indivíduos subclínicos quando comparadas com células de pacientes LC.



**Figura 9: Expressão do burst oxidativo após a infecção por *L .braziliensis* em monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea, indivíduos subclínicos e controles sadios:** Monócitos do sangue periférico de pacientes com LC (n=15), SC (n=07) controles sadios (n=05) foram marcados com anti-CD14,anti CD16 e DHR. Os resultados estão expressos em MFI do burst oxidativo produzidos. Todos os valores estão representados em média e desvio padrão e os valores de  $p$  foram obtidos através de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's (\*\* $p$ <0.01, \* $p$ <0.05).

#### **VII.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO BURST OXIDATIVO APÓS A INIBIÇÃO DAS ENZIMAS NADPH-OXIDASE E INOS EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA E DE INDIVÍDUOS SUBCLÍNICOS APÓS A INFECÇÃO COM *L. braziliensis*.**

Para distinguir se o aumento do burst oxidativo ocorreu devido à indução da via do NO ou à produção de reativos do oxigênio após a fagocitose dos parasitos opsonizados, os experimentos foram realizados na presença de inibidores de via do NO e da via do ROS.

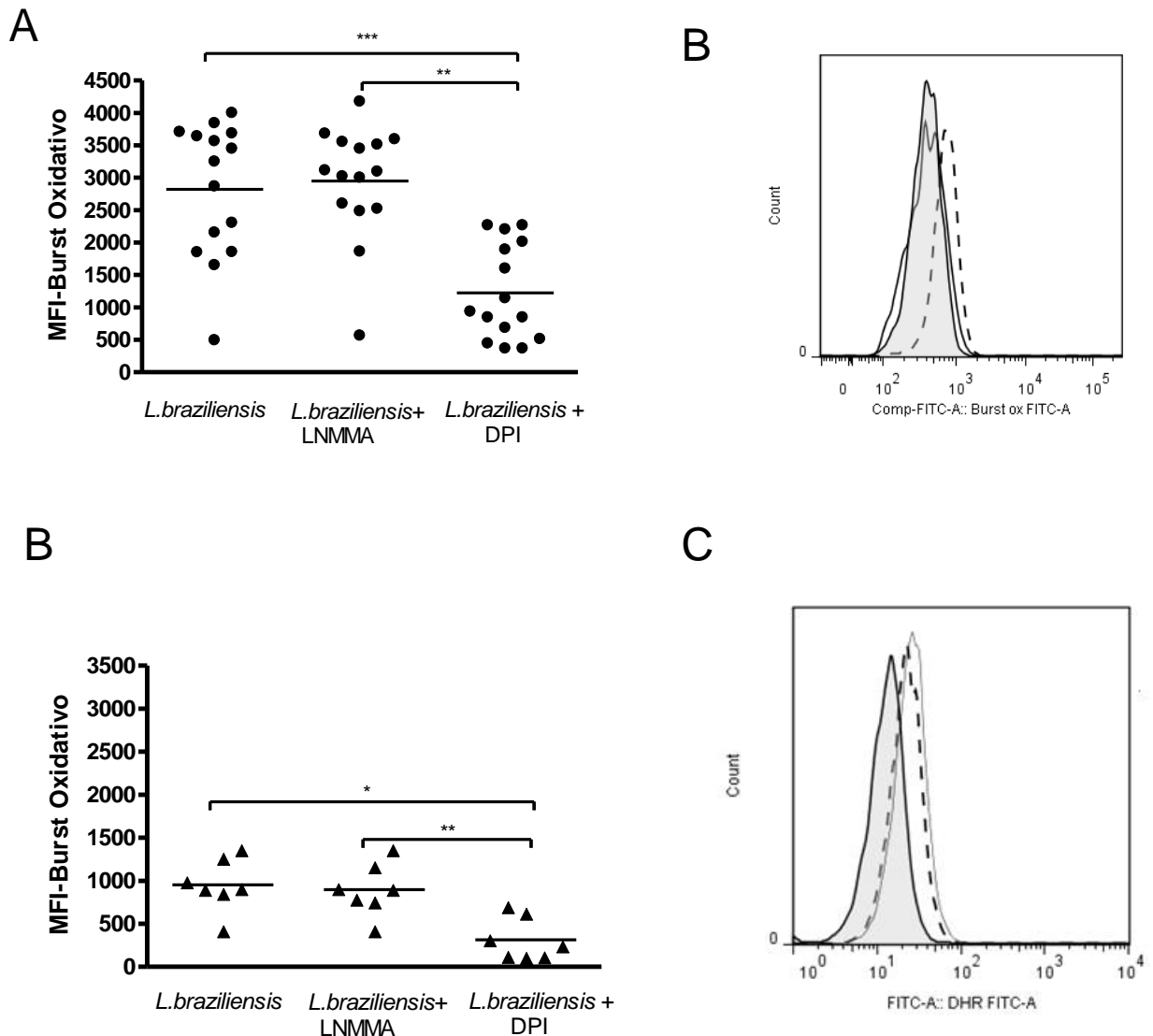
Foi avaliado a expressão do burst oxidativo após a inibição da NADPH-oxidase (enzima responsável pela produção das espécies reativas do oxigênio), e da óxido nítrico sintetase (enzima responsável pela produção do NO), através do uso dos inibidores DPI e L-NMMA respectivamente.

Após a inibição da enzima NADPH oxidase, foi observado uma diminuição significativa do MFI do burst oxidativo por monócitos de pacientes LC ( $1225 \pm 724$ ) quando comparado com as células que não tiveram nenhuma das vias de produção de oxidantes inibidas ( $2821 \pm 1040$ ), bem como em relação às células em que a enzima iNOS foi inibida ( $2948 \pm 879$ ) \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  (figura 10A).

Nas células de indivíduos SC, representado na figura 10C, após a inibição da enzima NADPH oxidase, foi observado uma diminuição significativa ( $314 \pm 247$ ) da expressão do burst oxidativo, em comparação as células que não sofreram inibição da via de produção de oxidantes ( $953 \pm 305$ ) \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ . Entretanto, não houve uma diferença estatística entre a produção de

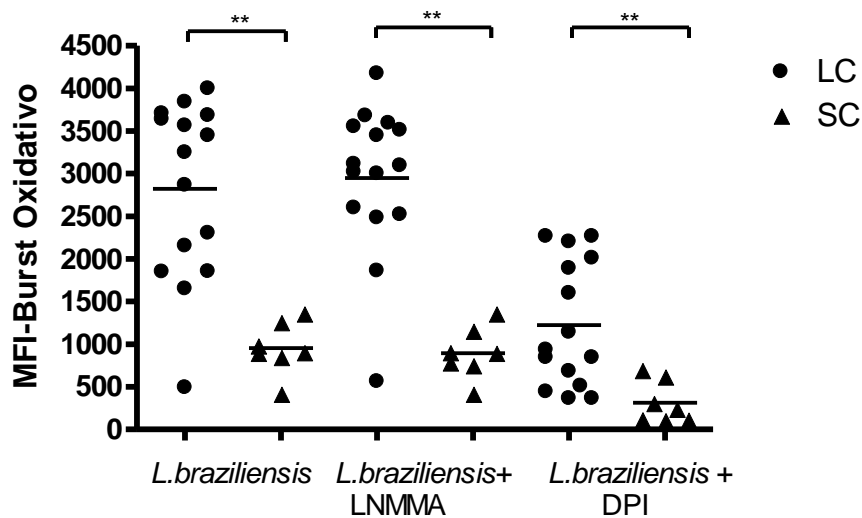
oxidantes após a inibição da via do NO em comparação com a inibição da via do ROS.

Esses resultados sugerem que existe uma maior indução de ROS quando comparado com a expressão de NO por células de ambos os grupos.



**Figura 10: Expressão do burst oxidativo por monócitos de pacientes com LC e indivíduos SC após a inibição da NADPH oxidase e da iNOS:** A expressão do burst oxidativo foi avaliada em monócitos de 15 pacientes LC (figura A) e de 7 indivíduos SC, após a infecção por *L. braziliensis*, (figura C). Os histogramas representativos das análises por citometria de fluxo estão apresentados nas figuras B e D. Os monócitos foram marcados com anti-CD14, anti-CD16 e DHR. Os resultados estão expressos em MFI de oxidantes produzidos. Os resultados estão representados em média e desvio padrão e os valores de  $p$  foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon e Mann Whitney \*\*\* $p < 0.001$  e \* $p < 0.05$ .

A comparação da expressão do burst oxidativo entre células de pacientes LC e células de indivíduos SC mostrou que as células dos indivíduos SC produzem menos esses oxidantes quando comparado com os pacientes LC e a inibição da via específica do ROS reduziu a expressão do burst oxidativo em ambos os grupos (figura 11).



**Figura 11: Expressão do burst oxidativo por monócitos infectados por *L.braziliensis* de pacientes com LC em comparação com indivíduos SC após a inibição da NADPH oxidase e da iNOS:** Monócitos de pacientes com LC (n=15) e SC (n=07), foram marcados com anti-CD14, anti-CD16 e DHR. Os resultados estão expressos em MFI de oxidantes produzidos. Todos os valores então expressos em média e desvio padrão e os valores de  $p$  foram obtidos através do teste estatístico de Mann Whitney (\*\* $p < 0.01$ ).

## VII.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO INTRACELULAR DE NO E ROS POR MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA APÓS A INFECÇÃO POR *L. braziliensis*

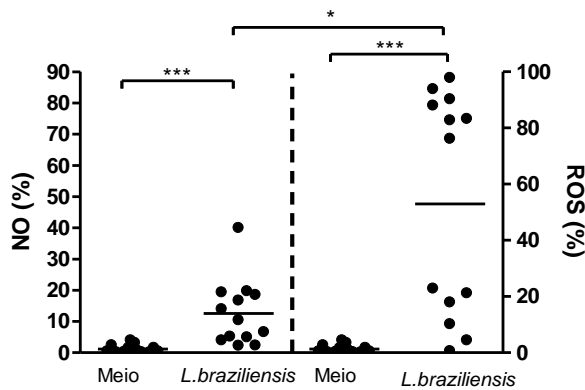
Para avaliar especificamente a produção do NO e do ROS após a infecção de monócitos por *L.braziliensis*, foi utilizada sondas fluorescentes intracelulares onde o DAF-FM diacetato determinou a produção de NO e a produção intracelular de ROS foi determinada através da sonda CMH-2DCFDA (Figura 12).

Foi demonstrado que a infecção dos monócitos de pacientes com LC por *L. braziliensis* induziu uma maior produção de ROS em comparação com a produção de NO ( $47\pm 35\%$  versus  $12\pm 10\%$  ) $*p<0.05$  ( figura 12A).

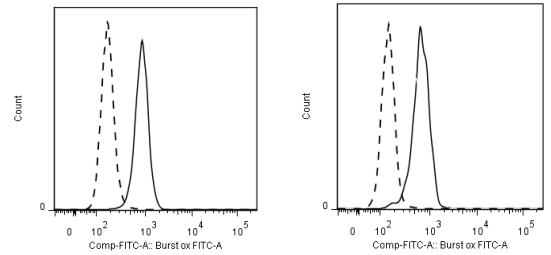
Para comprovar que a produção do NO e do ROS estava sendo aferida especificamente foram utilizados inibidores da NADPH oxidase e da oxido nítrico sintetase. Como demonstrado na figura 12C, foi comprovado que após a inibição da via de produção do NO e do ROS houve diminuição significativa da produção do NO ( $12\pm 10\%$  versus  $3\pm 2\%$ ) e do ROS ( $48\pm 35\%$  versus  $7\pm 5\%$ ) ( $*p<0.05$ ).



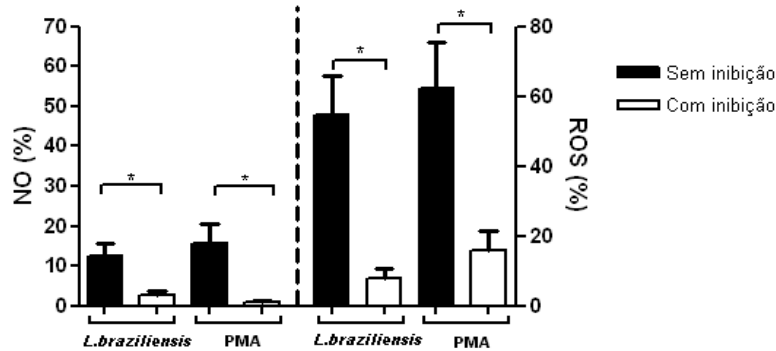
A



B



C



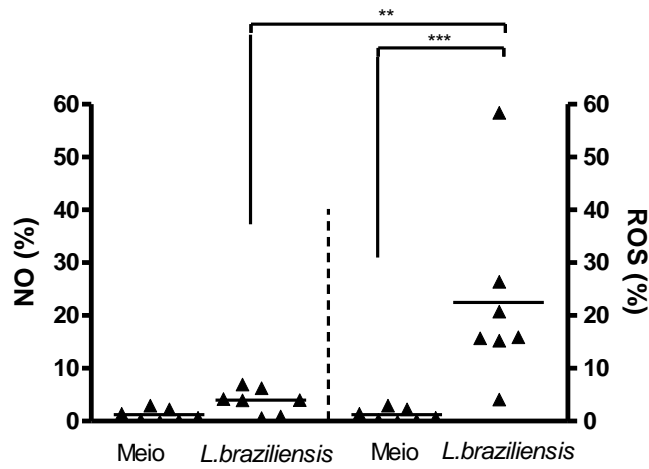
**Figura 12: Produção do NO e ROS por monócitos de pacientes com LC após a inibição das vias de produção dessas moléculas:** Monócitos do sangue periférico de pacientes com LC (n=13) foram marcados com anti-CD14, anti-CD16 e com marcadores específicos para NO e ROS (Figura A). O efeito da inibição das vias de produção dos oxidantes (DPI-ROS e L-NMMA- NO) e a aferição específica dessas moléculas foram demonstrados na figura C. Os resultados estão expressos em média (frequência) de oxidantes produzidos. E os histograma representativos das análises por citometria de fluxo estão apresentados na figura B. Teste estatístico de Mann Whitney \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05.

## VII.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO INTRACELULAR DE NO E ROS POR MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS SUBCLÍNICOS APÓS A INFECÇÃO POR *L. braziliensis*

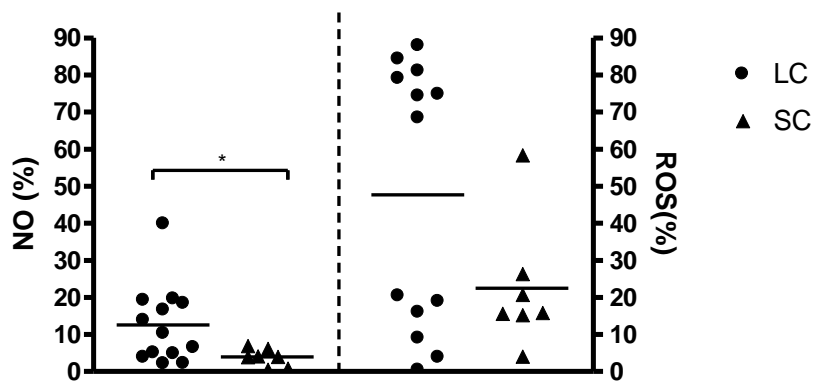
Ao avaliar a produção específica de NO e ROS em monócitos de indivíduos SC após a infecção por *L. braziliensis*, como apresentado na figura 13A, foi observado uma maior produção de ROS, quando comparado com a produção de NO ( $22\pm 17\%$  versus  $4\pm 2\%$ ) (\*\* $p < 0.01$ ).

Ao compararmos a produção de NO entre pacientes com LC e indivíduos SC na figura 13B, foi observado que a produção dessa molécula foi maior nos pacientes com LC ( $12\pm 10\%$  versus  $4\pm 2\%$ ) \* $p < 0.05$ . A produção de ROS também foi maior nos pacientes com LC quando comparado com a produção nos indivíduos SC (dados apresentados na figura 13B), entretanto não foi observada diferença estatística significativa ( $47\pm 35\%$  versus  $22\pm 17\%$ ).

A



B



**Figura 13: Comparação da Produção de NO e ROS entre monócitos de indivíduos SC e pacientes com LC após a infecção por *L. braziliensis*:** Monócitos de indivíduos SC (n=07) e pacientes com LC (n=13) foram marcados com anti-CD14,anti-CD16 com marcadores específicos para NO e ROS. A produção de NO e do ROS em indivíduos SC estão apresentadas na Figura A. produção do NO e do ROS entre os indivíduos SC são apresentados na Figura B. Os resultados estão expressos em média da porcentagem (frequência) de oxidantes produzidos. Valores de *p* obtidos através de do teste estatístico de Mann Whitney \*\*\**p*<0.001, \**p*<0.05.

## VII.7 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO E DA CARGA PARASITÁRIA DE MONÓCITOS DE PACIENTES LC APÓS A INFECÇÃO POR *L. braziliensis*

Para avaliar a importância do NO e do ROS na infecção dos monócitos com *L. braziliensis*, os monócitos foram infectados com *L. braziliensis* na proporção 5:1 após a inibição da NADPH-oxidase e da óxido nítrico sintetase, através do uso dos inibidores DPI e L-NMMA respectivamente. O número de células infectadas após os períodos de 2, 24, 48 e 72 horas de infecção, bem como a carga parasitária avaliada através do número de parasitos intracelulares foi através da técnica de microscopia óptica.

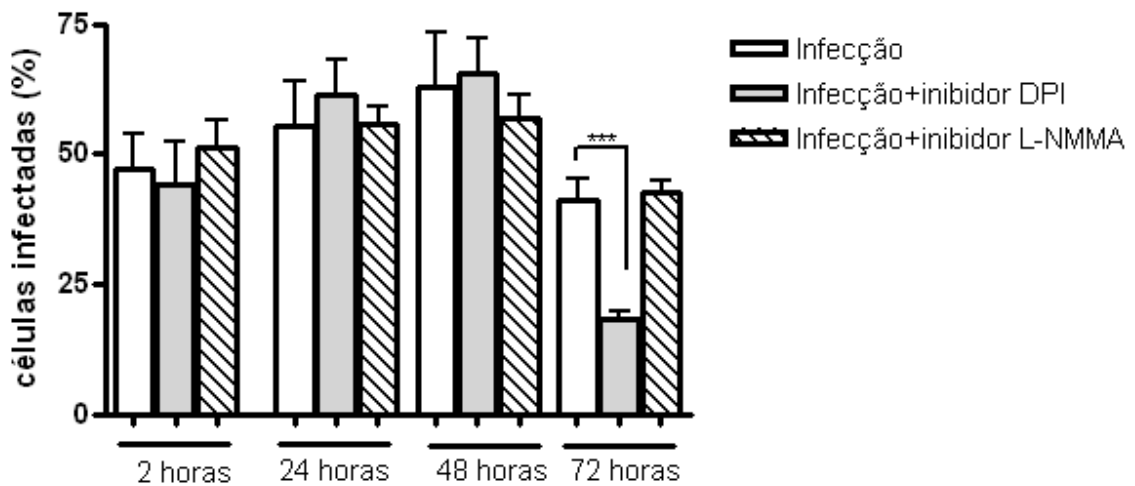
Como apresentado na figura 14A, nos períodos de 2, 24 e 48 horas de infecção por *L. braziliensis* não houve diferença estatística no número de monócitos infectados sem a presença de inibidores da produção de oxidantes bem como com a presença dos inibidores DPI e L-NMMA. Entretanto no período 72 horas de infecção, nas células que foram tratadas com inibidor da via de produção do ROS, houve diminuição da frequência de células infectadas ( $41 \pm 16\%$  versus  $18 \pm 5\%$ ) (\*\* $p < 0.001$ ).

Estes dados sugerem que a ausência de ROS favorece a replicação parasitária no interior dos monócitos e após 72 horas de infecção o excesso de parasitas provoca a lise celular e há uma diminuição de células integras albergando o parasito.

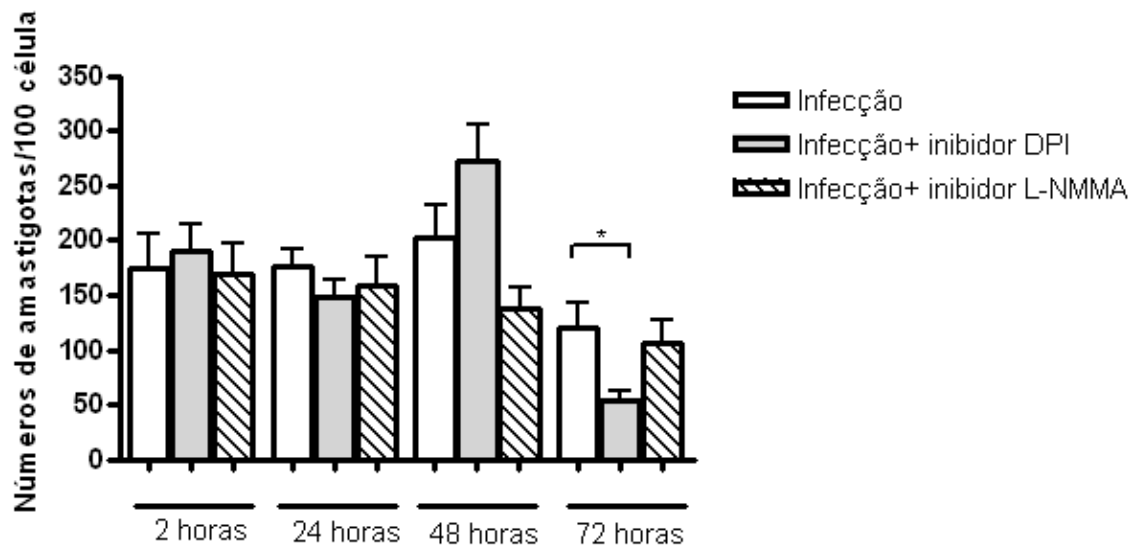
Em relação ao número de amastigotas, representado na figura 14B não houve variação estatisticamente significativa nos períodos de 2, 24 e 48 horas entre o número de parasitas nas células que sofreram inibição da via de

produção de oxidantes e nas células sem inibição. Entretanto, no período de 72 horas de infecção as células que foram tratadas com inibidor da via de produção do ROS, houve uma diminuição significativa da carga parasitária (  $119\pm 61\%$  versus  $53\pm 23\%$ ),  $*p < 0.05$ . Esses resultados de alguma forma estão de acordo com os resultados anteriores (figura 12A), sugerindo que em 72 horas de infecção o número grande de parasitos intracelulares pode ter provocado o rompimento das células e as *Leishmanias* foram liberadas para o meio extracelular.

A



B



**Figura 14: Avaliação da infecção e da carga parasitária de monócitos após a infecção por *L.braziliensis*:** Os monócitos de pacientes com LC (n=16) foram infectados com *L.braziliensis* na proporção de 5:1 após a inibição da NADPH oxidase e da iNOS. Foram avaliados os períodos de 2, 24, 48 e 72 horas de infecção. A figura A representa o número de células infectadas. A figura B representa a carga parasitária, obtida através da contagem de amastigotas intracelulares, utilizando a técnica de microscopia óptica. Os valores de  $p$  foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon (\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ ).

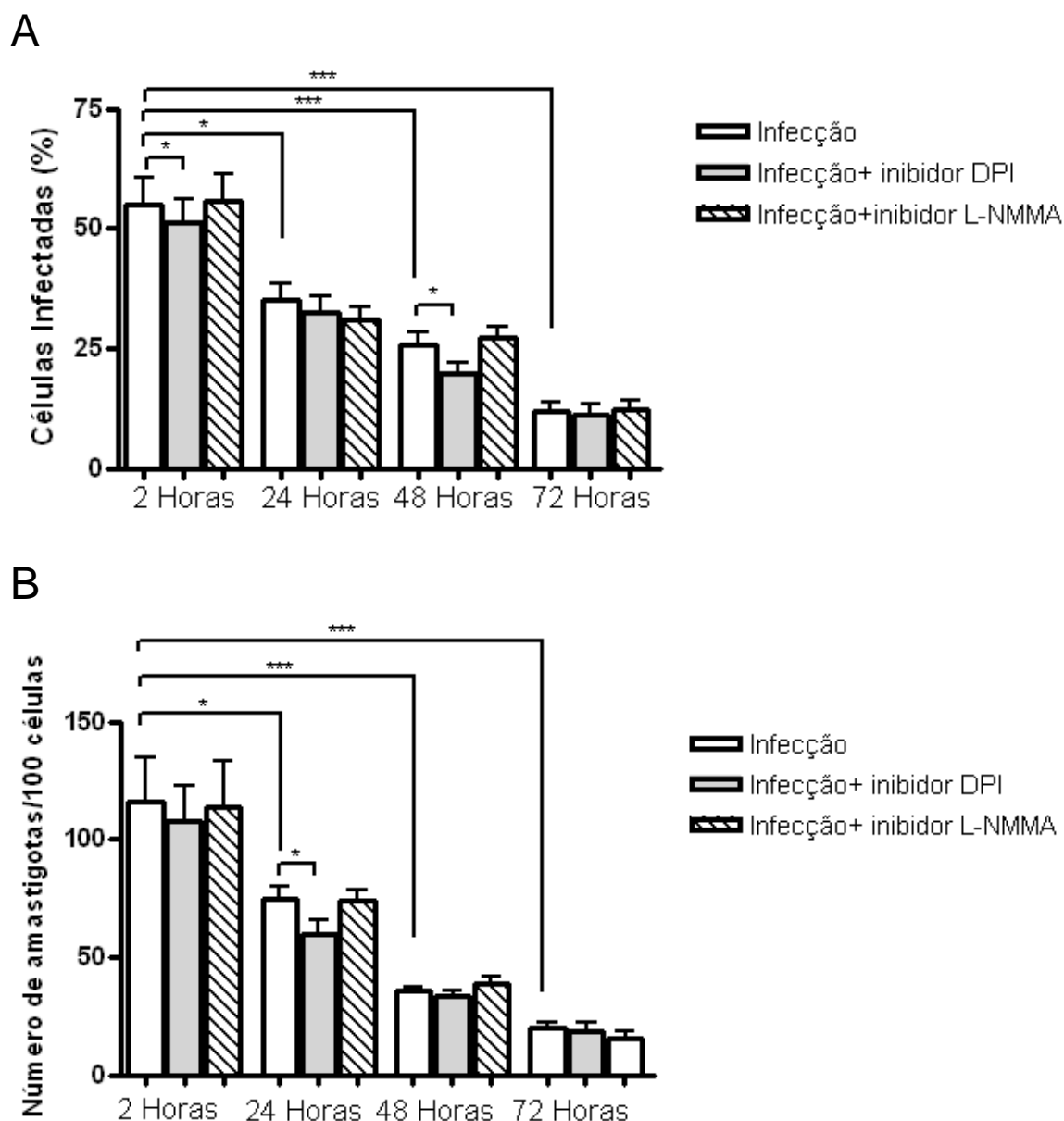
## VII.8 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO E DA CARGA PARASITÁRIA DE MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS SUBCLÍNICOS APÓS A INFECÇÃO POR *L.braziliensis*

Para avaliar o papel das moléculas oxidantes na infecção de monócitos de indivíduos SC por *L. braziliensis*, essas células foram infectados na proporção 5:1, após a inibição da NADPH-oxidase, e da óxido nítrico sintetase, através do uso dos inibidores DPI e L-NMMA respectivamente. O número de células infectadas após os períodos de 2, 24, 48 e 72 horas de infecção, bem como a carga parasitária realizada através do número de parasitos intracelulares foi avaliado através da técnica de microscopia óptica.

Como apresentado na figura 15 houve uma diminuição significativa do número de células infectadas (figura 15A) e no número de parasito intracelular (figura 15B) entre os períodos de 2, 24, 48 e 72 horas na ausência dos inibidores. O mesmo ocorre com macrófagos de indivíduos SC que são menos infectados e controlam mais a infecção do que macrófagos de pacientes LC (Giudice *et al.*, 2012).

Em relação ao número de amastigotas, representado na figura 13B não houve variação estatisticamente significante da carga parasitária nas células que não sofreram a inibição e nas células que tiveram inibição da NADPH oxidase e da óxido nítrico sintetase.

Estes dados sugerem que o burst oxidativo não é crucial no controle da infecção de monócitos por *L.braziliensis* de indivíduos SC e que provavelmente outras moléculas podem ser responsáveis pela diminuição da carga parasitária.



**Figura 15: Avaliação da infecção e da carga parasitária de monócitos de indivíduos SC após a infecção por *L. braziliensis* na presença de inibidores do NO e do ROS:** Os monócitos de indivíduos SC (n=07) foram infectados com *L.braziliensis* na proporção de 5:1 após a inibição da NADPH oxidase e da iNOS. Foram avaliados os períodos de 2, 24, 48 e 72 horas de infecção. A figura A representa o número de células infectadas. A figura B representa a carga parasitária, obtida através da contagem de amastigotas intracelulares, utilizando a técnica de microscopia óptica. Os valores de *p* foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon (\*\**p*<0.001, \**p*<0.05)

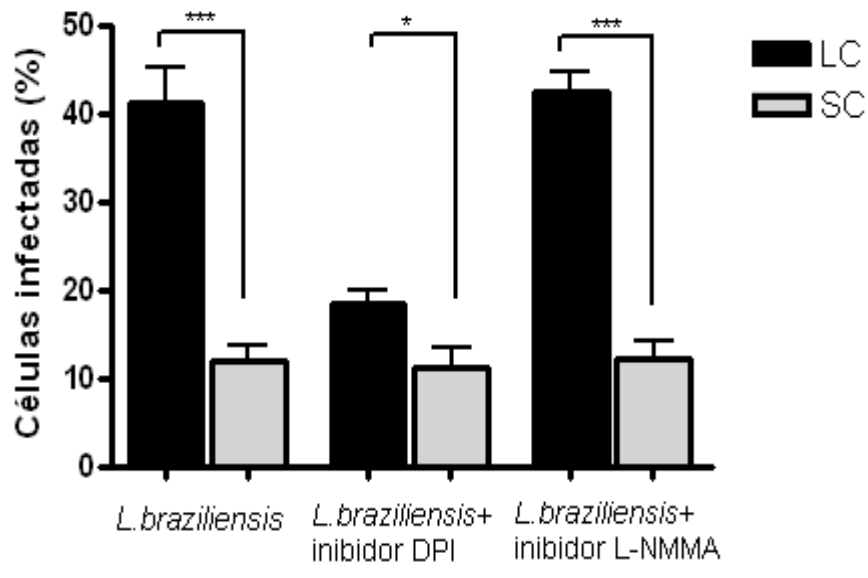


## VII.9 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO E DA CARGA PARASITÁRIA DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA E INDIVÍDUOS SUBCLÍNICOS APÓS 72 HORAS DE INFECÇÃO POR *L. braziliensis* APÓS A INIBIÇÃO DA NADPH OXIDASE E DA iNOS.

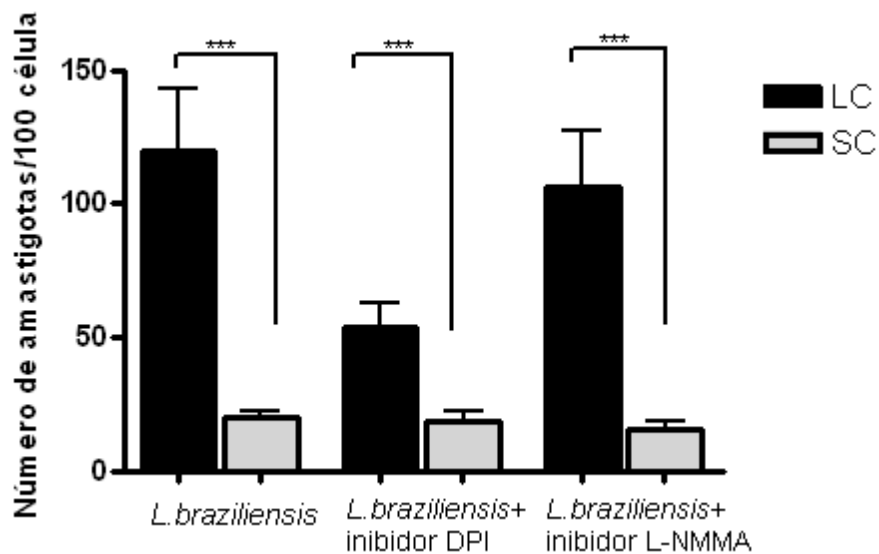
Ao comparar a frequência de monócitos infectados após 72 horas de infecção entre as células de pacientes com LC e indivíduos SC (apresentado na figura 16A) foi observado que o número de células infectadas pacientes LC ( $41\pm 16\%$ ) foi maior quando comparado com o número observado nos indivíduos SC ( $12\pm 4\%$ ) sem inibição das vias de produção de oxidantes,  $***p < 0.001$ . A inibição da NADPH oxidase e da óxido nítrico sintetase diminuiu mais o número de células infectadas nos pacientes LC quando comparado com os indivíduos SC ( $18\pm 5\%$ ;  $42\pm 9\%$  versus  $11\pm 5\%$ ;  $12\pm 5\%$ ),  $*p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$ .

Como apresentado na figura 16B, a carga parasitária foi maior nos pacientes com LC em comparação com indivíduos SC, mesmo entre as células que sofreram inibição da NADPH oxidase e da óxido nítrico sintetase, com diferença estatística significativa  $***p < 0.001$ . Entre os indivíduos SC a inibição das 2 vias não teve nenhum efeito no número de células infectadas e na carga parasitária ( $p > 0.05$ ), sugerindo que talvez essas essas 2 vias não sejam importantes no controle da infecção por células desses indivíduos.

A



B



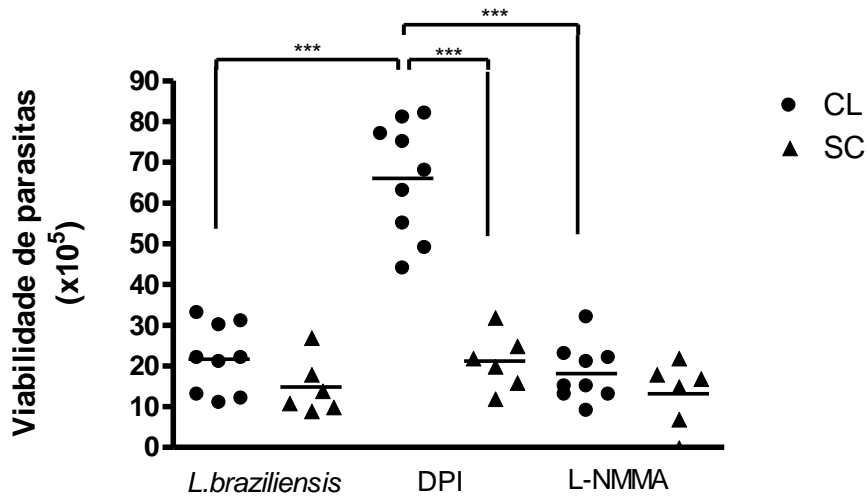
**Figura 16: Avaliação da infecção e da carga parasitária entre os monócitos de indivíduos LC e SC após 72 horas de infecção por *L. braziliensis*:** Os monócitos de pacientes com LC (n=15) indivíduos SC (n=07) foram infectados com *L. braziliensis* na proporção de 5:1 por diferentes períodos de tempo após a inibição da NADPH oxidase e da iNOS. Na figura A, está representado o número de células infectadas (%) e na figura B, o número de parasitos intracelulares. Todos os valores de *p* foram obtidos através do teste estatístico de Mann Whitney \*\*\**p*<0.001, \**p*<0.05.

## VII.10 AVALIAÇÃO DO PAPEL DE NO E DO ROS NO CONTROLE DA INFECÇÃO COM *L. braziliensis* EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA E DE INDIVÍDUOS SUBCLÍNICOS

Com o objetivo de avaliar o papel de NO e do ROS no controle da infecção nos dois grupos, foi avaliada a viabilidade dos parasitos após a inibição das duas vias, utilizando o DIP e o L-NMMA. Em cultura de células de pacientes LC a inibição da via do ROS aumentou significativamente a viabilidade dos parasitos após 72 horas de cultura em meio específico para o crescimento do parasito (Schneider) quando comparado com a cultura de células onde a via não foi inibida ( $21\pm 8\%$  versus  $66\pm 14\%$ ),  $***p < 0.001$ . Ao mesmo tempo, a inibição da via do NO não teve nenhum efeito na viabilidade dos parasitos ( $21\pm 8\%$  versus  $18\pm 7\%$ ),  $p > 0.05$  (Figura 17). Esses dados mais uma vez sugerem que a produção de NO parece não participar no controle da infecção por *L. braziliensis* por monócitos de pacientes com LC.

Em relação às células dos indivíduos SC, não houve diferença na viabilidade dos parasitos quando ambas as vias foram inibidas ( $14\pm 6\%$  versus  $21\pm 6\%$  e  $14\pm 6\%$  versus  $13\pm 8\%$ ),  $p > 0.05$ . Como as células dos indivíduos SC parecem controlar mais a infecção do que as células de pacientes com LC, (figuras 15A e 14A) a inibição dessas vias não interferiu na viabilidade dos parasitos. Entretanto foi observada uma diferença estatística na viabilidade dos parasitos quando comparamos a inibição da produção de ROS em monócitos de pacientes com LC com a inibição da produção de ROS em monócitos de indivíduos SC ( $66\pm 14\%$  versus  $21\pm 6\%$ ),  $***p < 0.001$ . Esses dados corroboram com as observações anteriores que mostraram que a produção de ROS parece

ser importante no controle da infecção por *L. braziliensis* por monócitos de pacientes com LC.



**Figura 17: Avaliação da viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* após a inibição das enzimas NADPH-oxidase e iNOS em monócitos de pacientes com LC e indivíduos subclínicos:** Os monócitos de pacientes com LC (n=09) e SC (n=06) após o tratamento com inibidores da NADPH oxidase e da iNOS e infecção com *L. braziliensis* por 2 horas foram mantidos em cultura com meio de cultura Schneider por 72 horas e foi avaliado o número de promastigotas viáveis nas culturas através da técnica de microscopia óptica. Todos os valores de *p* foram obtidos através do teste estatístico de Wilcoxon e Mann Whitney, \*\*\**p*<0.001.

## VII.11 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MIELOPEROXIDASE POR MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA, INDIVÍDUOS SUBCLÍNICOS E CONTROLES SADIOS, APÓS A INFECÇÃO POR *L. braziliensis*.

Outra molécula envolvida na morte de patógenos intracelulares é a mieloperoxidase (MPO) (Klebanoff *et al.*, 2013). Na leishmaniose visceral, onde é observada uma grande disseminação de parasitos, a produção de MPO é menor nos pacientes com leishmaniose visceral quando comparado com os controles sadios, sugerindo que baixa atividade dessa enzima pode contribuir na sobrevivência do parasito nos macrófagos (Kumar *et al.*, 2002).

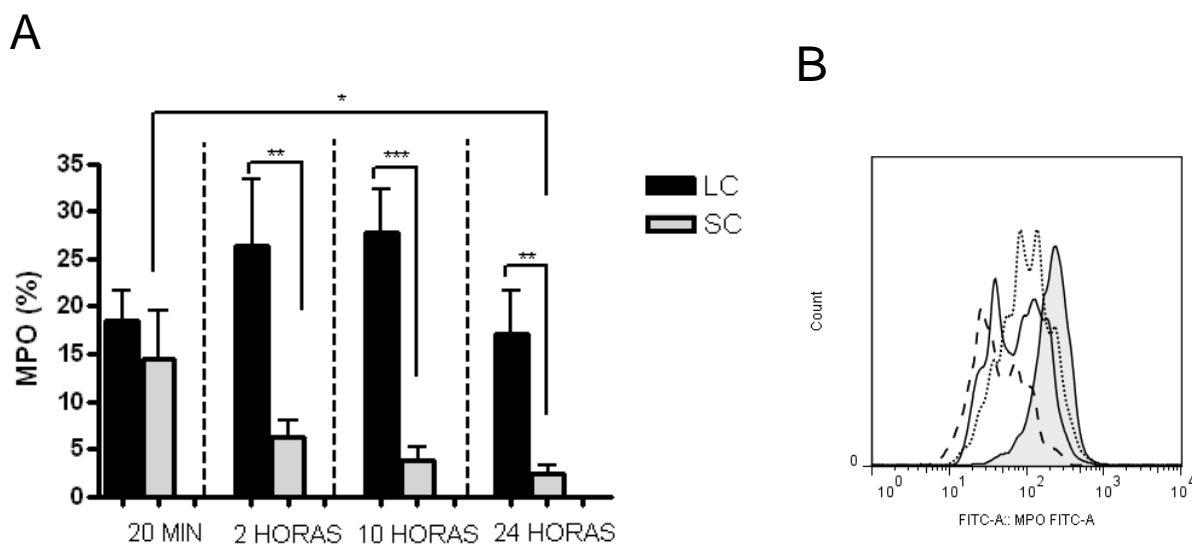
Nós avaliamos a produção de MPO por monócitos de pacientes com LC e de indivíduos SC após a infecção por *L. braziliensis*. Os monócitos foram marcados com anticorpos anti-CD14, anti-CD16 e a expressão da produção de mieloperoxidase foi determinada através da marcação intracelular com o uso de anticorpo anti-MPO e a detecção foi realizada através da técnica de citometria de fluxo.

A MPO foi produzida por células de pacientes com LC após a infecção por *Leishmania* em todos os períodos de tempo avaliados e não foi encontrada nenhuma diferença estatística entre os períodos. Monócitos de indivíduos SC também produziram essa enzima após a infecção com *Leishmania* e foi observada uma diminuição estatisticamente significativa após o período de 24 horas, \* $p < 0.05$  (figura 18)

Ao compararmos a produção de MPO entre os grupos, após 20 minutos de infecção a produção dessa enzima foi semelhante entre os pacientes LC e

os indivíduos SC ( $18\pm 7\%$  versus  $14\pm 16\%$ ). Entretanto nos períodos de 2, 10 e 24 horas houve maior produção de MPO em monócitos de pacientes com LC em comparação com os indivíduos SC ( $26\pm 15\%$ ;  $28\pm 10\%$ ;  $17\pm 10\%$  versus  $6\pm 5\%$ ;  $4\pm 4\%$ ;  $3\pm 4\%$ ), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . (figura 18A)

Para comprovar a produção do MPO por essas células foi utilizado como controle positivo o PMA e foi observado uma produção dessa enzima por células de pacientes com LC ( $27\pm 10\%$ ) e por células de indivíduos SC ( $14\pm 16\%$ )

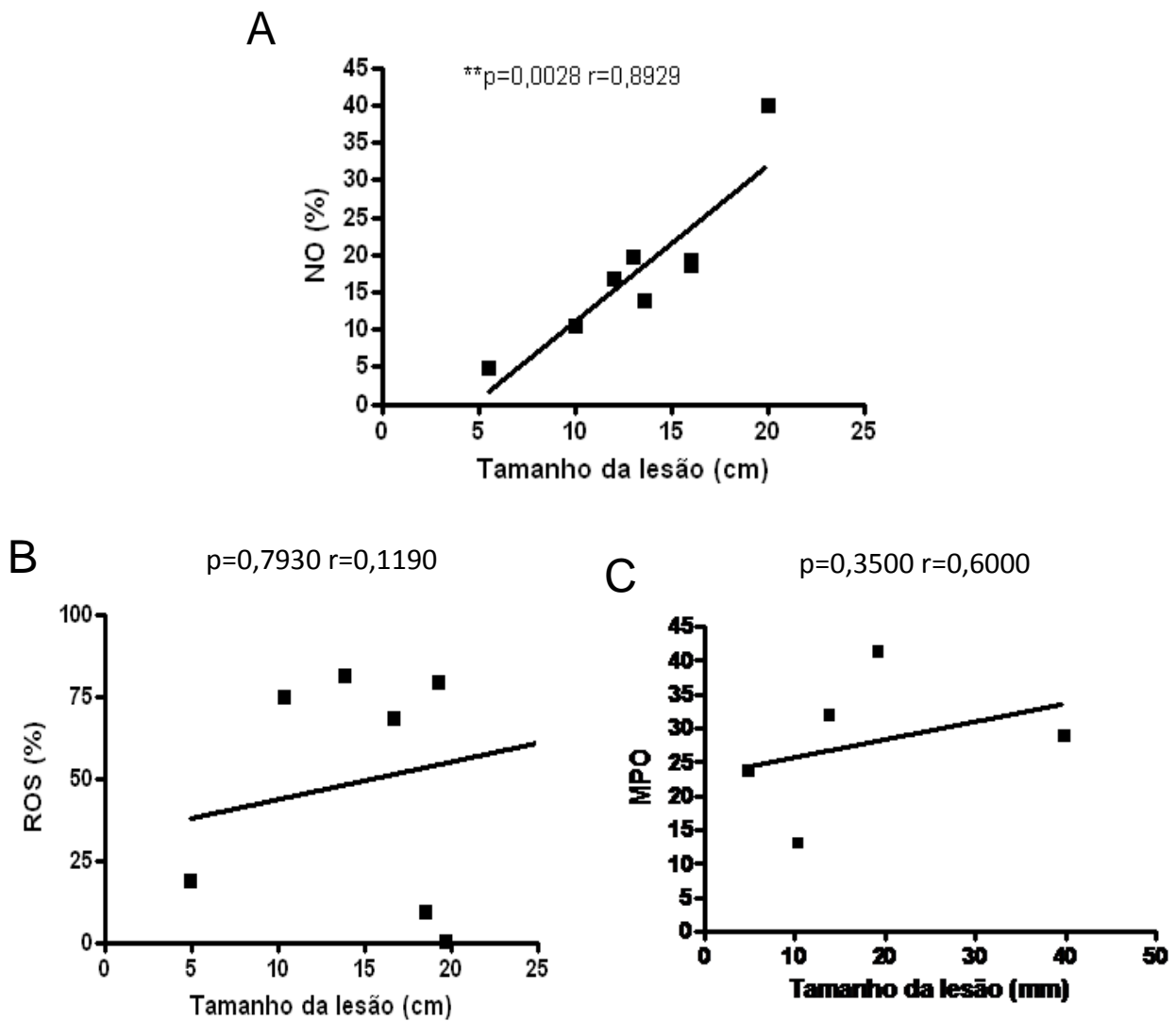


**Figura 18: Determinação da produção de MPO em monócitos de pacientes com LC e SC:** Os monócitos de pacientes com LC (n=05) e SC (n=10) foram marcados com anti-CD14 e anti-CD16 e produção de MPO foi determinada com a marcação intracelular com anticorpo anti-MPO(figura A). O histograma representativo das análises por citometria de fluxo estão apresentados na figura B. Os resultados estão expressos em porcentagem (frequência) de produção da enzima e os valores de  $p$  foram obtidos através de do teste estatístico de Mann Whitney (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$ ).

## VII.12 CORRELAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DOS OXIDANTES POR MONÓCITOS APÓS A INFECÇÃO POR *L. braziliensis* E O TAMANHO DA LESÃO EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Alguns dados da literatura já mostraram que a produção de NO pode estar envolvido no processo inflamatório de algumas doenças (Vane *et al.*, 1994; Laroux *et al.*, 2001; Coleman, 2001). Em relação à leishmaniose tegumentar Qadoumi *et al.*, (2002) demonstraram que na leishmaniose tegumentar causada por *Leishmania mexicana* a expressão de iNOS estava correlacionada com o número de lesões.

Neste estudo, através de uma análise de correlação entre a produção de NO e o tamanho da lesão dos pacientes com LC, foi observada uma correlação positiva, entre a produção desta molécula e o tamanho da lesão com um  $p=0.0028$  e o  $r =0,8929$ ,(figura 19A). Entretanto, não foi observada nenhuma correlação entre a produção de ROS e o tamanho da lesão,  $p>0.05$ ,  $r= 0.1190$  (figura 19B) e entre a produção da MPO e o tamanho da lesão  $p=0,3500$   $r=0,6000$  (Figura 19C) . Esses resultados de alguma forma fortalecem a nossa hipótese que a produção de NO não é importante para o controle da infecção por *L. braziliensis*, e que adicionalmente, a produção dessa molécula pode participar no desenvolvimento da ulcera característica da leishmaniose cutânea.



**Figura 19: Correlação entre a produção do NO e do ROS por monócitos após infecção com *L. braziliensis* com o tamanho da lesão de pacientes com LC:** A produção de NO por monócitos foi avaliada com as sonda DAF-FM diacetato, a de ROS através do CMH-2DCFDA e MPO através de anticorpo anti-MPO pela técnica de citometria de fluxo. Os resultados estão expressos em porcentagem (frequência) da produção de NO (figura A), ROS (figura B) e MPO (figura C). O diâmetro da lesão foi medido em milímetros e foi utilizada a média das dimensões. Todos os valores de  $p$  foram obtidos através do teste estatístico de correlação de Pearson.



## VIII. DISCUSSÃO

Como já está bem documentado que a resposta imune adaptativa, através da produção de citocinas pro-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e TNF) pelas células T, está envolvida na forte resposta inflamatória que é responsável pelo desenvolvimento da lesão em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*, estudos sobre o papel das células da resposta imune inata no controle da infecção por *L. braziliensis* têm se mostrado de grande importância.

Os macrófagos são as principais células que abrigam a *Leishmania* e conseqüentemente a sobrevivência ou a morte desse parasito depende da ativação dessas células. A ativação dos macrófagos consiste no aumento da expressão de HLA- DR e de moléculas co-estimulatórias, produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12 e TNF- $\alpha$ ), ânion superóxido ( $O_2^-$ ), óxido nítrico (NO) e quimiocinas.

Os mecanismos utilizados por macrófagos humanos para matar a *Leishmania* ainda não estão bem estabelecidos. Enquanto em camundongos tem sido observado um papel importante da produção de óxido nítrico no processo de morte da *Leishmania*, em humanos, a participação dessa molécula ainda é questionável (Assreuy, 1994; Evans, 1993; Murray, 1992).

Nesse estudo, foi mostrado o papel do NO e do ROS produzido pelos monócitos no controle da infecção por *L. braziliensis*.

Nossos dados demonstraram que a infecção por *Leishmania braziliensis* induziu a formação de burst oxidativo em monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea, e essa formação foi maior em monócitos de pacientes LC quando comparada com a produção por células de indivíduos saudáveis. Uma explicação possível para o aumento do burst oxidativo em monócitos de pacientes com LC é que possivelmente essas células estejam expressando mais 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 (TLR 4) estimula a síntese da NADPH oxidase e o aumento da produção de ROS (Sasada, 1983; Gill *et al.*, 2010). Mais recentemente, 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).

Alguns indivíduos residentes em área de transmissão de *L. braziliensis* apresentam uma reação de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania*, mas não desenvolvem a doença. As CMSP desses indivíduos produzem pouco IFN- $\gamma$  e TNF quando comparados com os pacientes com LC (Follador *et al.*, 2002; Schnorr *et al.*, 2012). Até o momento não está claro porque esses indivíduos SC tem a capacidade de controlar a infecção. Estudos anteriores já tinham mostrado que macrófagos desses indivíduos controlavam mais a infecção por *L. braziliensis* quando comparado com macrófagos de pacientes LC (Giudice *et al.*, 2012). Dessa forma, foi avaliada também a

produção do burst oxidativo por monócitos de indivíduos SC após a infecção por *L. braziliensis*. Nossos resultados mostraram que a produção de burst oxidativo é reduzida nessas células quando comparada com a produção por células de pacientes com LC, sugerindo que os monócitos de indivíduos SC não utilizam o burst oxidativo como principal mecanismo microbicida, no controle da infecção por *L. braziliensis*.

Em relação a participação do NO e do ROS na geração do burst oxidativo após a infecção por *Leishmania*, foi avaliado o efeito da inibição das enzimas NADPH oxidase e óxido nítrico sintetase na geração do burst oxidativo em monócitos de pacientes com LC e indivíduos subclínicos. Foi observado que após a inibição da NADPH oxidase houve uma diminuição significativa da indução do burst oxidativo tanto em células de pacientes LC quanto em indivíduos SC, sugerindo que o ROS está sendo mais produzido durante a resposta oxidativa contra a *L. braziliensis*. O inibidor da óxido nítrico sintetase (L-NMMA) demonstrou não alterar a produção do burst oxidativo, sugerindo uma baixa produção de NO pelos monócitos de pacientes com LC e indivíduos SC. Estes resultados estão consistentes com o estudo realizado por Chang *et al.*, (2007), que observou 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 macrófagos humanos,

demonstrando nestas células o NO parece não participar no controle da infecção por *L. chagasi*.

Para confirmar se a produção de ROS seria maior em comparação à produção de NO em pacientes com LC e indivíduos SC, nós empregamos o uso de sondas intracelulares específicas para a dosagem de ROS (CMH-2DCFDA) e NO (DAF FM diacetato), já descrita em outros modelos de infecção e de patologias não infecciosas (Zhang *et al.*, 2013; Metto *et al.*, 2013; Mesquita *et al.*, 2013; Barrera *et al.*, 2013). Os resultados confirmaram que a produção de ROS é maior que a produção de NO, após a infecção por *L. braziliensis*, em ambos os grupos (pacientes com LC e indivíduos SC).

Para avaliar a participação dessas moléculas no controle da infecção por *L. braziliensis* observou-se o efeito da inibição dessas moléculas no número de células infectadas e no número de parasitos intracelular em pacientes LC. Evidenciou-se que nos períodos de 2, 24 e 48 horas de infecção não houve variação do número de células infectadas bem como da carga parasitária quando as 2 vias responsáveis pela produção do NO e do ROS foram ou não inibidas. Entretanto, após 72 horas de infecção, houve diminuição significativa do número de células infectadas e do número de amastigotas após o tratamento com inibidores da NADPH oxidase. Nossos dados sugerem que o NO parece não ter um papel efetor no controle da infecção por *L. braziliensis*, enquanto a ausência do ROS favoreceu a replicação do parasito e a ruptura das células, diminuindo dessa forma o número de células infectadas e a carga parasitária.

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). Entretanto, 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 do ROS como substância leishmanicida (Degrossoli *et al.*, 2011; Fonseca-Silva, 2013).

Em relação aos indivíduos SC houve uma diminuição significativa do número de células infectadas e no número de amastigotas entre os diferentes períodos de tempo na ausência dos inibidores. Esses resultados confirmam observações anteriores onde macrófagos de indivíduos SC são menos infectados e controlam mais a infecção do que macrófagos de pacientes LC (Giudice *et al.*, 2012). Estes dados sugerem que o burst oxidativo parece não ser crucial no controle da infecção de monócitos por *L. braziliensis* de indivíduos SC e que provavelmente outras moléculas podem ser responsáveis pela diminuição da carga parasitária nesses indivíduos.

Para confirmar os nossos achados que após 72 horas de infecção nos pacientes LC a ausência de produção do ROS nos monócitos, favorecia a replicação parasitária e gerava a lise da célula, foi realizado um ensaio da viabilidade de parasitos, que consiste em quantificar as promastigotas viáveis em meio de cultura para *Leishmania* após a infecção das células na presença ou não dos inibidores. O aumento do número de promastigotas viáveis após 72 horas de infecção nos monócitos tratados com inibidor da via de produção do ROS sugere que a produção dessa molécula pode participar no controle da infecção. Entretanto nas células de indivíduos SC, a inibição das 2 vias não interferiu na sobrevivência das promastigotas, sugerindo que nesse grupo de indivíduos a resistência à infecção está relacionada com outros mecanismos.

Os resultados encontrados nesse estudo sugerem que a produção do NO na leishmaniose tegumentar americana parece não participar no controle da infecção por *L. braziliensis*. Entretanto, alguns estudos com outros modelos de infecção, tem correlacionado a expressão aumentada de iNOS com a lesão tecidual em algumas patologias como a hanseníase tuberculóide, a hanseníase bordeline tipo 1 e a psoríase (Kröncke *et al.*, 1998; Little *et al.*, 2001; Khanolkar-Young *et al.*, 1998). Ao analisarmos a produção intracelular de NO e o tamanho da lesão dos pacientes com LC foi encontrada uma forte correlação positiva entre esses parâmetros. Entretanto o mesmo não foi observado com a produção intracelular de ROS e o tamanho da lesão nesses pacientes. Esses dados nos dão suporte para sugerir que o NO não participa no controle da infecção enquanto parece participar do desenvolvimento da lesão tecidual observado nesses pacientes. Já tinha sido descrito na literatura que na leishmaniose tegumentar americana (causada por *L. mexicana*) havia uma forte

correlação entre a expressão da iNOS e o número de lesões cutâneas. (Qadoumi *et al.*, 2002). Outros estudos demonstraram que algumas citocinas, principalmente o IFN- $\gamma$ , estimulam a produção de iNOS (Murray *et al.*, 2011). A expressão dessa enzima também tem sido documentada em lesões de pacientes com LC. (Qadoumi *et al.*, 2002; Arevalo *et al.*, 2002; Díaz *et al.*, 2005; Morgado *et al.*, 2008). Como os pacientes com LC apresentam uma elevada produção de IFN- $\gamma$  no sangue periférico e no tecido (Bacellar *et al.*, 2002; Faria *et al.*, 2005), essa citocina estaria estimulando a produção de NO que conseqüentemente contribuiria também para o desenvolvimento da lesão cutânea observada nessas pacientes.

Outras moléculas podem estar associadas com o controle da carga parasitária como a mieloperoxidase, que catalisa reações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com um íon cloreto para produzir ácido hipocloroso que é usado para matar parasitas pelas células fagocíticas. Apesar do importante papel da MPO na defesa do hospedeiro, a sua deficiência é comum nos indivíduos sadios (Kumar *et al.*, 2002). Pouco se conhece o papel dessa enzima no controle da infecção por *Leishmania*. Recentemente, foi demonstrado na leishmaniose visceral humana, que a produção sérica de MPO foi maior nos pacientes quando comparada com a produção nos controles sadios (Elshafie *et al.*, 2011). Nossos dados demonstraram que a produção de MPO em monócitos de pacientes com LC é aumentada nas primeiras horas de infecção, entretanto nos indivíduos SC houve uma baixa produção de MPO nessas células, quando comparado com os monócitos de pacientes com LC. O aumento da MPO nos pacientes com LC reflete, provavelmente, o aumento da produção de ROS em especial da atividade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por essas células e a elevada atividade da enzima NADPH

oxidase (Kumar *et al.*, 2002). Outros estudos devem ser realizados para esclarecer o papel dessa enzima no controle da infecção por *L. braziliensis*.

Recentemente, tem-se demonstrado que o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), parece ter um efeito citotóxico maior em patógenos intracelulares. Em infecções por *Trypanosoma cruzi*, foi apresentada uma elevada toxicidade do  $\text{ONOO}^-$  produzidos pelo fagossomo dos macrófagos com o parasita, sugerindo que essa molécula teria potencial para eliminar o patógeno (Alvarez, *et al.*, 2010). Em estudos com a *Leishmania amazonensis*, têm-se mostrado que a formação de  $\text{ONOO}^-$  tem um maior efeito em amastigotas quando comparado com a produção de NO (Linares *et al.*, 2000; Van Assche *et al.*, 2011).

As observações obtidas nesse estudo sugerem que a produção de ROS parece estar relacionada com o controle da infecção por *L. braziliensis* por monócitos de pacientes com LC enquanto a produção de NO parece estar mais envolvida no desenvolvimento da lesão. Em relação aos indivíduos subclínicos não existe indicação que essas moléculas estejam envolvidas no controle da infecção e outros estudos serão necessários para avaliar outros mecanismos que poderiam estar relacionados com a proteção nesses indivíduos.



## **IX. SUMÁRIO DE RESULTADOS**

1. A infecção por *L. braziliensis* induz maior expressão de burst oxidativo em monócitos de pacientes com LC quando comparada com a expressão observada em monócitos de indivíduos SC.
2. A inibição da via específica do ROS reduziu a expressão do burst oxidativo em ambos os grupos.
3. Nos pacientes LC e nos indivíduos SC houve maior produção específica de ROS do que a produção de NO por monócitos infectados por *L. braziliensis*.
4. A produção de NO foi maior nos monócitos de pacientes com LC quando comparada com a produção dessa molécula por monócitos de indivíduos SC.
5. Não houve variação do número de células infectadas bem como da carga parasitária de pacientes com LC nos períodos de 2, 24 e 48 horas entre os grupos, entretanto após 72 horas houve diminuição tanto do número de células infectadas quanto da carga parasitária, nos monócitos onde a NADPH oxidase foi inibida. Esses resultados estavam associados a uma maior viabilidade das promastigotas no mesmo período de tempo e nas mesmas condições de cultura.

6. Nas células dos indivíduos SC foi observada uma diminuição significativa do número de células infectadas e no número de parasito intracelular entre os períodos de 2, 24, 48 e 72 horas mesmo na ausência dos inibidores. Ao mesmo tempo não houve diferença na viabilidade da promastigotas em 72 horas de cultura na presença ou na ausência dos inibidores.
7. A produção de NO possui correlação positiva com o tamanho da lesão.
8. Houve uma maior produção da MPO nos monócitos infectados por *L. braziliensis* de pacientes com LC em comparação às células de indivíduos SC.

## **X.PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Avaliar a influência do IFN- $\gamma$  na produção do NO e do ROS na infecção por *L. braziliensis*.
- Avaliar a função dos receptores Toll Like 2 e 4, na indução do burst oxidativo na infecção por *L. braziliensis*.
- Avaliar outros mecanismos envolvidos na morte da *L. braziliensis* como a participação ONOO $^-$ .

## **XI.CONCLUSÕES**

As observações obtidas nesse estudo mostram que a produção de ROS estar relacionada com o controle da infecção por *L. braziliensis* por monócitos de pacientes com LC enquanto a produção de NO está envolvida no desenvolvimento da lesão. Em relação aos indivíduos subclínicos não existe indicação que essas moléculas estejam envolvidas no controle da infecção e outros estudos serão necessários para avaliar outros mecanismos que poderiam estar relacionados com a proteção nesses indivíduos.

## XII.SUMARY

### **EVALUATION OF THE MECHANISMS INVOLVED IN THE KILLING OF *Leishmania braziliensis* BY MONOCYTES FROM PATIENTS WITH AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS**

**Introduction:** In cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*, pathogenesis is associated with an exaggerated Th1 response that is not appropriately modulated. There is much evidence that this response participates in the development of the skin lesions observed in this disease. Approximately 10% of individuals in an area of transmission of *L. braziliensis*, despite exposure to the parasite, did not show evidence of clinical disease and are considered to have a subclinical form of the disease. As the adaptive immune response does not seem to be involved in the eradication of the parasite or in the control of the infection, studies on the role of cells of the innate immune response in the control of *L. braziliensis* has shown great importance. Monocytes/macrophages are the main cells that harbor *Leishmania*, and their activation depends mainly on the production of IFN- $\gamma$  by T and NK cells, which brings about cellular processes such as the generation of an oxidative burst. Two groups of oxidants are important in the control of *Leishmania* infection, reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO), which are produced in response to phagocytosis and after activation of these cells, respectively. In a murine model of infection, the production of NO by macrophages has been shown to be involved in *Leishmania* death. However, the mechanisms used by these cells in humans are not yet well established. Objective: To evaluate the role of NO and ROS in controlling *L. braziliensis* infection by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis (CL) and subclinical individuals (SC).

**Methods:** Monocytes from patients with CL (n = 25) and from subclinical individuals (n = 09) were infected with *L. braziliensis* at 5:1 ratio and evaluated after different periods of time. The determination of the production of oxidative radicals by flow cytometry was performed by oxidation of Dihidrorodamina 123 (DHR -123) after the inhibition of NO production (L- NMMA- inhibitor of nitric oxide synthetase) and after the inhibition of ROS production (DPI -inhibitor of NADPH oxidase enzyme). The intracellular production of NO and ROS was determined by using specific intracellular probes (DAF - FM diacetate and

2DCFDA HCM) with flow cytometry. To evaluate the effects of oxidants in the control of infection within monocytes, optical microscopy was used to determine the number of infected cells and the number of amastigotes. **Results:** After *L. braziliensis* infection, the expression of the oxidative burst by monocytes from patients with CL was higher when compared to SC individuals and healthy controls. After the inhibition of NADPH oxidase, a significant decrease in expression of the oxidative burst by monocytes from CL patients was observed, suggesting that there is higher ROS production by these cells. The evaluation of the intracellular production of these oxidants shows that the production of ROS is higher than the NO production in patients with CL. The production of NO was higher in CL patients compared with the production in cells of SC individuals, and ROS production was also higher in patients with LC, but without significant differences. NO production was significantly correlated with the size of the lesions in patients with CL. After 72 hours of infection, the number of infected cells and the parasite load were significantly decreased in the cell cultures where NADPH oxidase was inhibited. These results were associated with the viability of the promastigotes at the same time and under the same conditions. **Conclusions:** These results suggest that the production of ROS is important in the control of *L. braziliensis* infection by monocytes from patients with CL while the production of NO seems to be more related to lesion development in these patients. Regarding subclinical individuals, there is no indication that these molecules are involved in infection control. **Keywords:** Leishmania; nitric oxide; reactive oxygen species.

### **XIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA**

Almeida TF, Palma LC, Mendez LC, Noronha-Dutra AA, Veras PS. Leishmania amazonensis fails to induce the release of reactive oxygen intermediates by CBA macrophages. *Parasite Immunology*, Oct;34(10):492-8. 2012.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7(5):e35671. 2012.

Alvarez MN, Peluffo G, Piacenza L, Radi R. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized Trypanosoma cruzi: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *The Journal of Biological Chemistry*, Feb 25;286(8):6627-40. 2011.

Arevalo I, Ward B, Matlashewski G. Detection of iNOS gene expression in cutaneous leishmaniasis biopsy tissue. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Apr 30;121(1):145-7. 2002.

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. *Europe The Journal of Immunology*, Mar;24(3):672-6. 1994.

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*, Dec;70(12):6734-40. 2002.

Barrera P, Sülsen VP, Lozano E, Rivera M, Beer MF, Tonn C, Martino VS, Sosa MA. Natural Sesquiterpene Lactones Induce Oxidative Stress in Leishmania mexicana. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013:163404. 2013.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Feb;87(4):1620-4. 1990.

Ben Salah A, Louzir H, Chlif S, Mokni M, Zaatour A, Raouene M, Ismail RB, Dellagi K. The predictive validity of naturally acquired delayed-type hypersensitivity to leishmanin in resistance to Leishmania major-associated cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, Dec 1;192(11):1981-7. 2005.

Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Jan-Mar;86(1):51-6.1991.

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. *Europe The Journal of Immunology*, May;33(5):1224-34. 2003.

Blough, N. V., and Zafiriou, D. C. *Inorganic Chemistry* . 24,3504-3505.1985

Bogdan C. Regulation of lymphocytes by nitric oxide. *Methods in Molecular Biology*, 677:375-93. 2011.

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 and Parasitol*, Nov;84(2):188-94. 1996.

Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radical Biology & Medicine*, Dec 1;33(11):1440-50. 2002.

Carta S, Castellani P, Delfino L, Tassi S, Venè R, Rubartelli A. DAMPs and inflammatory processes: the role of redox in the different outcomes. *Journal of Leukocyte Biology*, Sep;86(3):549-55. 2009.

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*, Dec;76(6):2066-9. 1985.

Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, Apr;56(4):315-25. 1994.

Carvalho LP, Passos S, Schriefer A, Carvalho EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, Oct 4;3:301. 2012.

Chang HK, Thalhoffer 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*, Feb;75(2):1017-24. 2007.

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*, Oct;53(2):345-55. 1984.

Chatelain R, Mauze S, Varkila K, Coffman RL. Leishmania major infection in interleukin-4 and interferon-gamma depleted mice. *Parasite Immunology*, Aug;21(8):423-31. 1999.

Charmoy M, Auderset F, Allenbach C, Tacchini-Cottier F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by Leishmania parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.

Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, Aug;1(8):1397-406. 2001.

Degrossoli A, Arrais-Silva WW, Colhone MC, Gadelha FR, Joazeiro PP, Giorgio S. The influence of low oxygen on macrophage response to Leishmania infection. *Scand The Journal of Immunology*, Aug;74(2):165-75. 2011.

Dewald B, Baggiolini M, Curnutte JT, Babior BM. Subcellular localization of the superoxide-forming enzyme in human neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation*, Jan;63(1):21-9. 1979.

Díaz NL, Fernández M, Figueira E, Ramírez R, Monsalve IB, Tapia FJ. Nitric oxide and cellular immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol*, May;28(3):288-93. 2003.

Elshafie AI, Hlin E, Håkansson LD, Elghazali G, Safi SH, Rönnelid J, Venge P. Activity and turnover of eosinophil and neutrophil granulocytes are altered in visceral leishmaniasis. *International Journal for Parasitology*, Mar;41(3-4):463-9. 2011.

Evans DA, Lanham SM, Baldwin CI, Peters W. The isolation and isoenzyme characterization of *Leishmania braziliensis* subsp. from patients with cutaneous leishmaniasis acquired in Belize. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(1):35-42. 1984.

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*, Jul 15;151(2):907-15. 1993.

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*, Dec;73(12):7853-9. 2005.

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*, Jun 1;34(11):E54-8. 2002.

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*, Aug 23;76(8):1505-8. 2013.

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*, Jul 15;167(2):893-901. 2001.

Ganster RW, Taylor BS, Shao L, Geller DA. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Jul 17;98(15):8638-43. 2001.

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*, Jul;154(1):62-9. 2007.

Ghafourifar P, Schenk U, Klein SD, Richter C. Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *The Journal of Biological Chemistry*, Oct 29;274(44):31185-8. 1999.

Ghosh S, Goswami S, Adhya S. Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage. *Biochemical Journal*, Feb 1;369(Pt 3):447-52. 2003.

Gill R, Tsung A, Billiar T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radical Biology & Medicine*, May 1;48(9):1121-32. 2010.

Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, Carvalho LP, Delavechia T, Carvalho EM, Bacellar O. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infectious Diseases*, Mar 29;12:75. 2012.

Giulivi C. Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. *Biochemical Journal*, Jun 15;332 ( Pt 3):673-9. 1998.

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.

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

Gorak PM, Engwerda CR, Kaye PM. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *European Journal of Immunology*, Feb;28(2):687-95. 1998.

Holzmueller P, Sereno D, Lemesre JL. Lower nitric oxide susceptibility of trivalent antimony-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Oct;49(10):4406-9. 2005.

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.

Kavoosi G, Ardestani SK, Kariminia A. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). *Parasitology*, Sep;136(10):1193-9. 2009.

Khanolkar-Young S, Snowdon D, Lockwood DN. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TGF-beta) in leprosy lesions. *Clinical & Experimental Immunology*, Sep;113(3):438-42. 1998.

Khoury 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*, Feb 15;182(4):2525-31. 2009.

Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. *Science*, Sep 11;169(3950):1095-7. 1970.

Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourn CC, Nauseef WM. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *Journal of Leukocyte Biology*, Feb;93(2):185-98. 2013.

Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clinical & Experimental Immunology*, Aug;113(2):147-56. 1998.

Kumar P, Pai K, Pandey HP, Sundar S. NADH-oxidase, NADPH-oxidase and myeloperoxidase activity of visceral leishmaniasis patients. *Journal of Medical Microbiology*, Oct;51(10):832-6. 2002.

Kwon NS, Nathan CF, Gilker C, Griffith OW, Matthews DE, Stuehr DJ. L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase. The ureido oxygen derives from dioxygen. *The Journal of Biological Chemistry*, Aug 15;265(23):13442-5. 1990.

Laroux FS, Pavlick KP, Hines IN, Kawachi S, Harada H, Bharwani S, Hoffman JM, Grisham MB. Role of nitric oxide in inflammation. *Acta Physiologica | The Scandinavian*, Sep;173(1):113-8. 2001.

Lemos MP, Esquivel F, Scott P, Laufer TM. MHC class II expression restricted to CD8alpha+ and CD11b+ dendritic cells is sufficient for control of *Leishmania major*. *The Journal of Experimental Medicine*, Mar 1;199(5):725-30. 2004.

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*, Aug;65(2):87-9. 2001.

Liew FY, Li Y, Millott S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology*, Dec;71(4):556-9. 1990.

Liew FY. Role of cytokines in killing of intracellular pathogens. *Immunology Letters*, Oct;30(2):193-7. 1991.

Liew FY, Xu D, Chan WL. Immune effector mechanism in parasitic infections. *Immunol Letters*, Jan;65(1-2):101-4. 1999.

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*, Jun 1;30(11):1234-42. 2001.

Little JW, Doyle T, Salvemini D. Reactive nitroxidative species and nociceptive processing: determining the roles for nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in pain. *Amino Acids*, Jan;42(1):75-94. 2012.

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*, Jun 15;34(12):E69-73. 2002.

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*, Mar 15;44(6):788-93. 2007.

Marsden PD. Clinical presentations of *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Parasitology Today*, Nov;1(5):129-33. 1985.

Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*,80(6):859-76.1986.

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*, Feb;108(1):18-22. 2013.

Mesquita JT, Tempone AG, Reimão JQ. Combination therapy with nitazoxanide and amphotericin B, Glucantime(®), miltefosine and sitamaquine against *Leishmania(Leishmania) infantum* intracellular amastigotes. *Acta Tropica*, Nov 13. 2013.

Metto EC, Evans K, Barney P, Culbertson AH, Gunasekara DB, Caruso G, Hulvey MK, Fracassi da Silva JA, Lunte SM, Culbertson CT. An integrated microfluidic device for monitoring changes in nitric oxide production in single T-lymphocyte(jurkat) cells. *Analytical Chemistry*, Nov 5;85(21):10188-95. 2013.

Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radical Biology & Medicine*, Aug 15;47(4):344-56. 2009.

Ministério da Saúde/SVS. <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/2009>.

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. *Journal of Leukocyte Biology*, May;79(5):881-95. 2006.

Mollinedo F, Janssen H, de la Iglesia-Vicente J, Villa-Pulgarin JA, Calafat J. Selective fusion of azurophilic granules with *Leishmania*-containing phagosomes in human neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, Nov 5;285(45):34528-36. 2010.

Morgado FN, Schubach A, Rosalino CM, Quintella LP, Santos G, Salgueiro M, Conceição-Silva F. Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *British Journal of Dermatology*, Jan;158(1):50-8.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, Dec;8(12):958-69. 2008.

Mukbel RM, Patten C Jr, Gibson K, Ghosh M, Petersen C, Jones DE. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Apr;76(4):669-75. 2007.

Murray HW, Teitelbaum RF. L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. *The Journal of Infectious Diseases*, Mar;165(3):513-7. 1992.

Nathan CF, Hibbs JB Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current Opinion in Immunology*, Feb;3(1):65-70. 1991.

Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Aug 1;97(16):8841-8. 2000.

Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*, Mar;6(3):173-82. 2006.

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*, Dec 15;183(12):8088-98. 2009.

Novoa R, Bacellar O, Nascimento M, Cardoso TM, Ramasawmy R, Oliveira WN, Schriefer A, Carvalho EM. IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* Infection. *Parasite Immunology*, Feb;33(2):132-6. 2011.

Oza SL, Shaw MP, Wyllie S, Fairlamb AH. Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Jan;139(1):107-16. 2005.

Paramchuk WJ, Ismail SO, Bhatia A, Gedamu L. Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania*

chagasi: role in pathogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Dec 1;90(1):203-21. 1997.

Pearson RD, Steigbigel RT. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of Immunology*, Oct;127(4):1438-43. 1981.

Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Rölinghoff M, Bogdan C. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity*, Aug;70(8):4638-42. 2002.

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*, Jan;31(1):143-8. 1998.

Rittig MG, Bogdan C. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitology Today*, Jul;16(7):292-7. 2000.

Robinson LJ, Weremowicz S, Morton CC, Michel T. Isolation and chromosomal localization of the human endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene. *Genomics*, Jan 15;19(2):350-7. 1994.

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 Negligence Tropical Disease*, 6(2):e1492. 2012.

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*, Oct;9(7):985-95. 2013.

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*, Aug 25;258(16): 9631-5. 1983.

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.

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*, Nov 1;168(5): 1675-84. 1988.

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*, Apr;36(4):433-41. 2006.

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 & Experimental Immunology*, Jun;172(3):403-9. 2013.

Teixeira CR, Teixeira MJ, Gomes RB, Santos CS, Andrade BB, Raffaele-Netto I, Silva JS, Guglielmotti A, Miranda JC, Barral A, Brodskyn C, Barral-Netto M. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *The Journal of Immunology*, Dec 15;175(12):8346-53. 2005.

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*, Dec 15;186(12):1829-34. 2002.

Vale-Costa S, Gomes-Pereira S, Teixeira CM, Rosa G, Rodrigues PN, Tomás A, Appelberg R, Gomes MS. Iron overload favors the elimination of *Leishmania infantum* from mouse tissues through interaction with reactive oxygen and nitrogen species. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 7(2):e2061. 2013.

Van Assche T, Deschacht M, da Luz RA, Maes L, Cos P. Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radical Biology & Medicine*, Jul 15;51(2):337-51. 2011.

Vane JR, Mitchell JA, 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*, Mar 15;91(6):2046-50. 1994.

Von Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, Udey MC. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, Oct 19;188(8): 1547-52. 1998.

Zhang Y, Liu H, Yin H, Wang W, Zhao X, Du Y. Nitric oxide mediates alginate oligosaccharides-induced root development in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, Oct;71:49-56. 2013.



Ziegler-Heitbrock HW. Definition of human blood monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, May;67(5):603-6. 2000.

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, Oct 21;116(16):e74-80. 2010.

## **XIV. ANEXOS**

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

**Nome do Projeto:** Determinantes do hospedeiro e do parasito na leishmaniose tegumentar humana: resposta imune protetora e patológica na leishmaniose tegumentar

**Investigador Principal:** Edgar M. Carvalho, médico, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brazil.

**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 50 ml de sangue (mais ou menos 2 xícaras) 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 em um (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 rubricar todas as páginas e assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar e a outra ficará com o pesquisador.

- Sim, eu concordo que a amostra de sangue e / ou pele sejam retiradas para estudo.
- Não, eu não concordo que a amostra de sangue e / ou pele sejam retiradas para estudo.

---

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:

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE EM CONTROLES SADIOS

**Nome do Projeto:** Determinantes do hospedeiro e do parasito na leishmaniose tegumentar humana: resposta imune protetora e patológica na leishmaniose tegumentar

**Investigador Principal:** Edgar M. Carvalho, médico, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brazil.

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

**Nome do Participante:** \_\_\_\_\_

**Número de Identificação no Projeto:**

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

Você é convidado (a) a participar como voluntário de um estudo que tem como objetivo entender porque as pessoas têm leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa. Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo aos médicos que fazem parte do projeto. Antes de concordar em participar desta pesquisa é importante que você leia este documento, e caso decida participar do estudo você será solicitado (a) a assinar este formulário de consentimento.

#### **Participação Voluntária:**

A sua participação no estudo é voluntária e você estará contribuindo para o melhor entendimento da doença Leishmaniose Tegumentar Americana. Você é livre para recusar a participar no estudo.

#### **Finalidade do Estudo:**

Este estudo vai estudar como o seu corpo se defende quando atacado pela leishmania. Para isto estudaremos o seu sangue.

Procedimentos:

**Caso concorde em participar do estudo, você doará 30 a 50 ml de sangue (mais ou menos 2 colheres de sopa) para separação das células de defesa e pesquisa dos mecanismos de defesa do organismo frente à infecção por leishmania.**

Confidencialidade:

Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe científica. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

**Análises de Riscos e Benefícios:**

A retirada de sangue nos pacientes pode provocar dor leve devido à punção com agulha. Em casos raros se acompanha de sangramento ou mancha na pele. A retirada de sangue venoso é um procedimento médico de rotina, e todos os cuidados apropriados serão tomados.

**Retorno de Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:**

O entendimento de como a resposta imune contribui para o desenvolvimento da leishmaniose tegumentar trará benefícios grandes aos portadores da doença, inclusive o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

**Custos:**

Você não terá custos com a participação no estudo e nem receberá pagamento por sua participação.

**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, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgar 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 possa ser guardada para pesquisa no futuro.
- Não, eu não concordo que a amostra de sangue possa ser guardada 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.É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e direitos relacionados a este projeto.

---

Assinatura do pesquisador

Data

Hora

**ANEXO III:  
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



**Universidade Federal da Bahia**

**Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos  
Diretoria Adjunta de Ensino, Pesquisa Extensão(DAEPE)**



**Complexo  
HUPES**

**Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)**

Rua Augusto Viana, s/n – Canela. Salvador - Bahia CEP: 40.110-060

E-mail: [cep.hupes@gmail.com](mailto:cep.hupes@gmail.com)


Tel.: (71) 3283-8043 FAX: (71) 3283-8141

**PARECER/RESOLUÇÃO**

Para análise e deliberação deste Comitê o Professor Doutor, **Edgar Marcelino de Carvalho**, Pesquisador responsável pelo Projeto de Pesquisa “**RESPOSTA IMUNE PROTETORA E PATOLÓGICA NA INFECÇÃO POR *Leishmania braziliensis***” integrado ao Projeto **DETERMINANTES DO HOSPEDEIRO E DO PARASITO NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR** sob número 25/2012, apresentou as modificações sugeridas nos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido.

Inexistindo na proposição analisada conflito ético que contrariem as disposições vigentes, ficam as mesmas **APROVADAS**.

Salvador, 22 de abril de 2013

  
\_\_\_\_\_  
**Professor Doutor Roberto Badaró**  
**Coordenador do CEP CHUPES**



**ANEXO IV:**

**NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DO ARTIGO NA  
INFECTION AND IMMUNITY**