



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO

GENIL MORORÓ ARAÚJO CAMELO JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR *Leishmania*
braziliensis RESISTENTE OU SUSCEPTÍVEL AO ANTIMÔNIO NO MODELO DA
BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA**

FORTALEZA

2017

GENIL MORORÓ ARAÚJO CAMELO JÚNIOR

AVALIAÇÃO DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR *Leishmania braziliensis* RESISTENTE OU SUSCEPTÍVEL AO ANTIMÔNIO NO MODELO DA BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Área de concentração: Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Jania Teixeira.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C189a Camelo Júnior, Genil Mororó Araújo.

Avaliação da reação inflamatória induzida por *Leishmania braziliensis* resistente ou susceptível ao antimônio no modelo da bolsa de ar subcutânea / Genil Mororó Araújo
Camelo Júnior. – 2017.

54 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Maria Jania Teixeira.

1. *Leishmania braziliensis*. 2. Leishmaniose tegumentar. 3. Bolsa de ar subcutânea. 4. Recrutamento leucocitário. 5. Resistência ao antimônio. I. Título.

CDD 570

GENIL MORORÓ ARAÚJO CAMELO JÚNIOR

AVALIAÇÃO DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR *Leishmania braziliensis* RESISTENTE OU SUSCEPTÍVEL AO ANTIMÔNIO NO MODELO DA BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Jania Teixeira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

MSc. Naya Lúcia de Castro Rodrigues
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Erika Freitas Mota
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A todos que estiveram do meu lado
nesses últimos anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família. Meus pais, minhas irmãs, Michelle e Karen, e minhas sobrinhas, Paola e Laís, obrigado por servirem de apoio e porto seguro para mim desde sempre. Agradeço também aos meus padrinhos, Antero e Viviane, e à minha família estendida, Paulo, Tio Paulo e Tia Dorothea.

Aos meus professores, sejam da UFC ou da NUIG, obrigado por servirem de exemplo do tipo de profissional de quero ser. Agradeço, especialmente, à Professora Jânia, por me inspirar já na disciplina de Parasitologia, pela confiança em mim e orientação nessa etapa final do curso, além do carinho e jeito divertido de ser; eu não poderia desejar uma orientadora melhor. A alguns outros professores seletos, obrigado por servirem de reafirmação de como eu não quero ser.

Sou grato que só aos meus colegas de turma, Adryelle, Alice, Alex, Amanda, Bárbara, Bia, Cleantony, DD, Felipe, Fernanda, Gabriel, Jp, Júnior, Kariny, Karol, Laísh (e Lílian), Laís, Letícia, Natalia, Olga, Thaís, Wladia e muitos outros que ficaram pelo caminho. Seja passar noites no Google hangout ou ir juntos a festas, ir de IC de um laboratório para outro ou viajar pela Europa, aguentar professora bêbada ou cantar incessantemente karaokês nas voltas das aulas de campo, quase morrer de dúvidas sobre o curso ou se fantasiar de ovelha, levar desaforo de professor ou rir da nossa própria desgraça, unicórnio ou rocha (ou é pedra?), o que importa é que passamos por tudo isso juntos. O motivo maior de eu não me arrepender desses quatro, cinco, sei lá quantos anos, foi ter passado por tudo isso com vocês, e eu faria tudo de novo sem pensar duas vezes. Espero que, mesmo mais distantes, sempre sejamos próximos como somos e busquemos nos tornar pessoas melhores.

Obrigado a todos do laboratório por terem me acolhido quando eu apareci do nada na Parasitologia. Agradeço, especialmente, à Aline, minha primeira amiga lá, que muito me ajudou no início e continua ajudando; à Rafaele, pelas preparações corridas em véspera de experimento; à Priscilla, porque somos, disparado, a melhor dupla da semana; e ao Rafael, por aguentar, firme e forte, os experimentos comigo até de noite. Agradeço também à Luanna, minha psicóloga, e ao Phillipe, meu personal, por me manterem psicológica e fisicamente são durante todo esse processo.

Pela minha experiência em ensino, agradeço meus amigos e professores da monitoria do BIOLAB. I also thank the Cell EXPLORERS team, specially Dr. Muriel Grenon, for letting me realize that I am able to do more than I thought I could and for being super fast at replying my emails.

Aos meus amigos de Galway, Carol, Derick, Fer, Kagol, Karol, Letícia, Mari, Marina, Marlon, Pikler, Ricardo, Rick, Natasha, Daiany, Juliana, Virgínia, Alessandra e Mariel, por terem passado por um ano inteiro de descobertas e experiências novas junto a mim, compartilhando as alegrias e angústias de estar fora da nossa zona de conforto, obrigado demais. Não vejo a hora de ver todos vocês de novo. Enquanto isso, King regards. Obrigado também, Santiago, que a Irlanda aproximou de mim, por aguentar minhas reclamações desde lá.

Aos meus amigos mais antigos, Carla, Juliane, Gabriel, Nicole, Anita, Dan e Leo, obrigado por crescerem comigo e por, mesmo depois de todo esse tempo, não terem desistido de mim. Que esses mais de 10 anos virem ainda mais.

*“An té a bhíonn siúlach bíonn sé
scéalach”*

Provérbio irlandês

RESUMO

A leishmaniose tegumentar é uma das mais importantes doenças infecto-parasitárias negligenciadas, causada por parasitos do gênero *Leishmania*, sendo *L. (Viannia) braziliensis* o mais relevante agente etiológico da doença no Brasil, e transmitida pela picada de insetos do gênero *Lutzomyia*. A doença apresenta diversas manifestações clínicas, que dependem tanto do estado imunológico do hospedeiro quanto da espécie de *Leishmania*. O conhecimento da resposta imunológica nas primeiras horas à infecção por *L. (V.) braziliensis* é essencial para o entendimento da doença, uma vez que tem grande importância no controle ou estabelecimento da infecção. Glucantime é o medicamento de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose no Brasil, mas a existência de cepas resistentes é um grave problema. No presente trabalho, o modelo da bolsa de ar subcutânea foi utilizado em camundongos BALB/c para analisar a resposta inflamatória inicial de duas cepas de *L. (V.) braziliensis*, uma susceptível e outra resistente ao antimônio. Para isso, camundongos BALB/c foram submetidos às bolsas de ar em seus dorsos, utilizando inóculos de cepas de *L. braziliensis* resistente ou susceptível ao antimônio, ou salina (controle negativo). Após 12 h dos estímulos, foram coletados os exsudatos das bolsas de ar para avaliação do recrutamento e fenótipo celular. A cepa resistente apresentou recrutamento leucocitário inferior ($246,7 \pm 27,88 \times 10^4$ células/ml) à cepa susceptível ($525 \pm 77,76 \times 10^4$ células/ml), que se refletiu na contagem diferencial, também com menor recrutamento de macrófagos ($15,05 \pm 2,468 \times 10^4$ células/ml) e linfócitos ($5,061 \pm 0,8926 \times 10^4$ células/ml) comparado com a cepa sensível (macrófagos: $41,09 \pm 10,97 \times 10^4$ células/ml; linfócitos: $12,22 \pm 3,654 \times 10^4$ células/ml), sugerindo que a cepa resistente é capaz de ser menos notada pelo sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, foram observados mais neutrófilos no exsudato de ambas cepas, que podem servir como hospedeiros temporários para as promastigotas. É provável que os macrófagos presentes não se apresentem num estado pró-inflamatório, o que também contribuiria para o recrutamento diminuído de linfócitos. Em suma, esses mecanismos podem promover ao parasito com perfil de resistência um local seguro e uma porta de entrada silenciosa na sua célula hospedeira, favorecendo a sua sobrevivência.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*. Leishmaniose tegumentar. Bolsa de ar subcutânea. Recrutamento leucocitário. Resistência ao antimônio.

ABSTRACT

Tegumentar leishmaniasis is one of the most important neglected infectious parasitic diseases. It is caused by parasites belonging to the genus *Leishmania*, transmitted by sandflies from genus *Lutzomyia*, and has *L. (Viannia) braziliensis* as the most relevant etiologic agent in Brazil. This disease shows a broad spectrum of clinical manifestations, which depend on both host's immune response and species and strain of *Leishmania* that is infecting it. The knowledge of the onset of the immune response during the first hours after *L. (V.) braziliensis* infection is essential for the understanding of the disease, hence its importance in infection control or establishment. Glucantime is the first choice medicine for treating leishmaniasis in Brazil, but the uprise of resistant strains is one of its main problems. In the present work the air pouch model was performed using BALB/c mice to assess the initial inflammatory response caused by two strains of *L. (V.) braziliensis*, one of which is susceptible to treatment by antimony, while the other resists it. In order to address it, BALB/c mice had air pouches made on their backs, using antimony resistant or susceptible *L. braziliensis* inocula, or saline (negative control). 12 h after stimulation, the air pouch exudate was collected to assess cell recruitment and phenotype. The resistant strain showed an inferior leukocyte recruitment ($246.7 \pm 27.88 \times 10^4$ cells/ml) when compared to the susceptible strain ($525 \pm 77.76 \times 10^4$ cells/ml), along with decreased recruitment of macrophages ($15.05 \pm 2.468 \times 10^4$ cells/ml) and lymphocytes ($5.061 \pm 0.8926 \times 10^4$ cells/ml) in the differential counting, again compared to the susceptible strain (macrophages: $41.09 \pm 10.97 \times 10^4$ cells/ml; lymphocytes: $12.22 \pm 3.654 \times 10^4$ cells/ml), suggesting that the resistant strain has the ability to be less noticed by the host's immune system. Other than that a higher number of neutrophils was detected in the exudates of both strains, which may serve as transient hosts for promastigotes. It is likely that the macrophages collected are not be in a pro-inflammatory state, therefore contributing to the low lymphocyte recruitment. In short those mechanisms may provide the resistant parasite a safe place to be in and a silent way of entering its host cell, enhancing its survivability.

Keywords: *Leishmania braziliensis*. Tegumentar leishmaniasis. Subcutaneous air pouch. Leukocyte recruitment. Antimony resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp., mostrando fases no vetor e no hospedeiro vertebrado.....	2
Figura 2 – Interação do complexo <i>Leishmania</i> -neutrófilo servindo como fonte de infecção para macrófagos, pelos modelos de transferência por cavalo de Troia e coelho de Troia.....	12

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Contagem total de leucócitos no exsudato inflamatório dos grupos com salina, cepa resistente ao antimônio e cepa susceptível ao antimônio.....	22
Gráfico 2 – Contagem diferencial de leucócitos recrutados no exsudato inflamatório dos grupos com salina, com cepa resistente e com cepa susceptível.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais espécies causadoras de leishmaniose tegumentar nas Américas, suas manifestações clínicas mais comuns e principais locais de ocorrência.....	4
---	---

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA: Albumina sérica bovina

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

ICAM: Molécula de adesão intercelular

IFN: Interferon

IL: Interleucina

LCD: Leishmaniose cutânea difusa

LCL: Leishmaniose cutânea localizada

LD: Leishmaniose disseminada

LM: Leishmaniose mucosa

LPG: Lipofosfoglicano

LRC: Leishmaniose recidiva cútis

LTA: Leishmaniose tegumentar americana

MIP: Proteína inflamatória de macrófago

NK: *Natural killer*

NO: Óxido nítrico

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos

PBS: Solução tampão fosfato

PGE: Prostaglandina E

PMN: Polimorfonucleares

PSG: *Promastigote secretory gel*

Sb⁵⁺: Antimonial pentavalente

SMF: Sistema mononuclear fagocítico

TGF: Fator de transformação de crescimento

TLR: Receptor do tipo *toll*

TNF: Fator de necrose tumoral

VCAM: Molécula de adesão celular vascular

WHO: *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

LISTA DE SÍMBOLOS

® Marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	As leishmanioses	1
1.2	Leishmaniose tegumentar americana (LTA)	4
1.2.1	Manifestações clínicas	5
1.2.2	<i>Tratamento</i>	8
1.3	Resposta imunológica na leishmaniose tegumentar	9
1.4	Experimentação <i>in vivo</i> de infecção por <i>L. (V.) braziliensis</i> e o modelo da bolsa de ar subcutânea	15
2	JUSTIFICATIVA	17
3	OBJETIVO.....	19
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1	Animais.....	20
4.2	Parasitas.....	20
4.3	Bolsa de ar subcutânea.....	20
4.4	Desenho experimental.....	21
4.5	Análise estatística	21
5	RESULTADOS	22
6	DISCUSSÃO	24
7	CONCLUSÕES	28
	REFERÊNCIAS	29
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (CEUA-UFC).....	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 As leishmanioses

Nem todas as doenças recebem a mesma atenção e investimentos. Algumas se encontram num grupo chamado de doenças tropicais negligenciadas, as quais prevalecem em países tropicais e subtropicais, afetando principalmente populações em situação de pobreza, sem saneamento adequado e expostas a vetores (WHO, 2017).

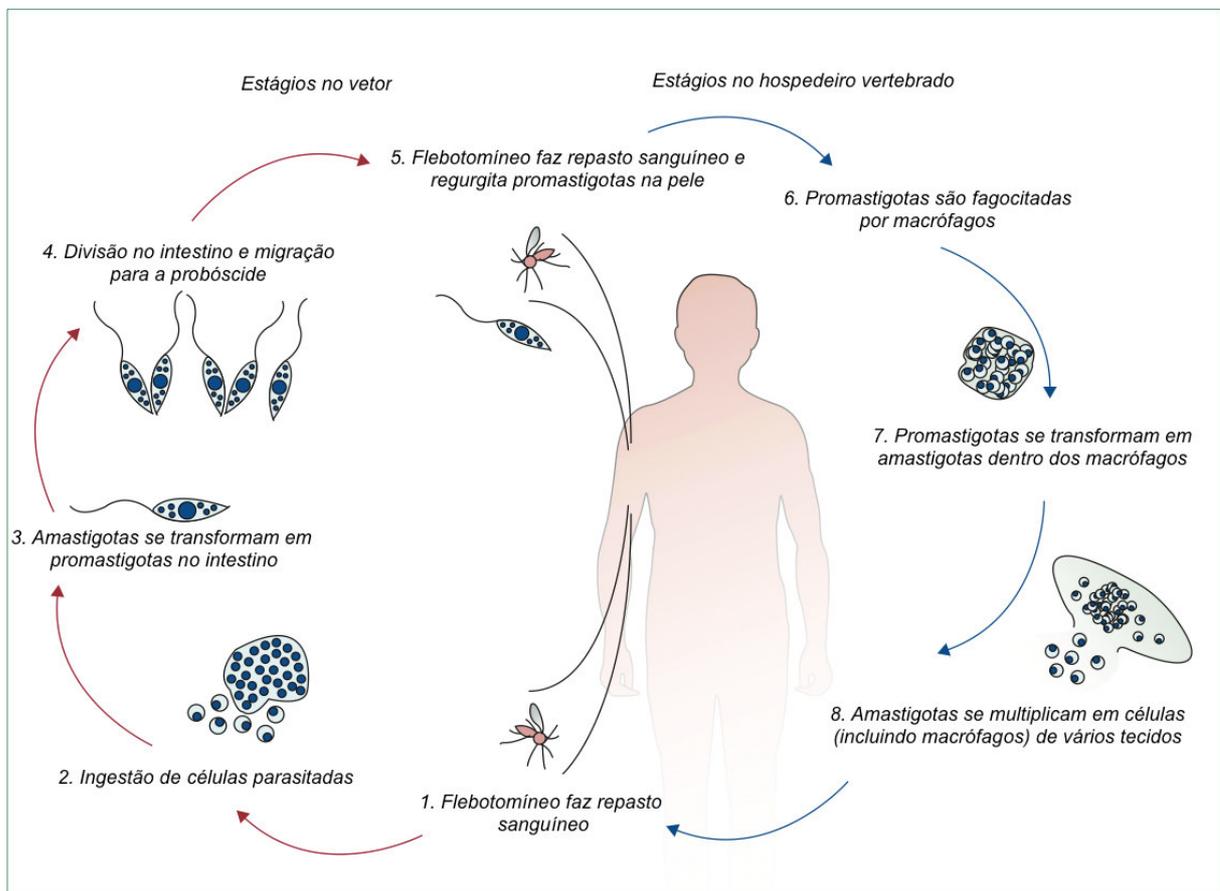
Entre elas, as leishmanioses se caracterizam como uma das mais importantes (HOTEZ *et al.*, 2006). Estas correspondem a um grupo de doenças infecciosas causadas por mais de 20 espécies de parasitos do gênero *Leishmania*, cujas manifestações clínicas são dependentes do estado imunológico do hospedeiro, da espécie e virulência da *Leishmania* (PEARSON; SOUSA, 1996).

As leishmanioses são antropozoonoses, mas seus ciclos podem ser também silvestres, com infecção humana acidental, ou até mesmo antroponóticos, dependendo da espécie de *Leishmania* e do local (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). A maioria dos ciclos de transmissão era mantida em locais silvestres por barreiras ecológicas, mas a infecção humana começou quando houve interrupção do ciclos zoonóticos e entrada do ser humano nessas áreas, em grande parte por atividades ocupacionais, e pelo fato dos vetores serem antropofílicos (LAINSON; KILLICK-KENDRICK; FLISSER, 1988; PEARSON; SOUSA, 1996). Desflorestamento, perda de biodiversidade e urbanização também são fatores relevantes para a mudança dos ciclos de transmissão para um padrão antroponótico (MOLYNEUX, 2003; ROTUREAU, 2006).

Os vetores de transmissão da leishmaniose são os flebotomíneos do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo (PEARSON; SOUSA, 1996). A relação entre a espécie de *Leishmania* e a espécie do vetor depende de vários fatores. Alguns vetores, tidos como permissivos, conseguem transmitir mais de uma espécie de *Leishmania*, enquanto algumas têm uma relação mais estrita (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). Por exemplo, *L. infantum* é transmitida no novo mundo principalmente por *Lutzomyia longipalpis*, enquanto *L. braziliensis* tem, como seu vetor, *Lutzomyia wellcomei*, mas possui outros seis vetores secundários (ROTUREAU, 2006; BATES, 2007).

O ciclo da leishmaniose se dá como ilustrado na Figura 1. Durante o repasto sanguíneo, as fêmeas de flebotomíneos infectadas laceram a pele do hospedeiro vertebrado, mamífero, e formam uma poça de sangue, da qual se alimentam, e acabam por ingerir macrófagos infectados com as formas amastigotas, presentes no vacúolo parasitóforo (BATES, 2007). No inseto, as amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas, que se multiplicam no intestino médio (subgênero *Leishmania*) ou na porção posterior do intestino (subgênero *Viannia*) do vetor (PEARSON; SOUSA, 1996; BATES, 2007).

Figura 1 – Ciclo de vida de *Leishmania* sp., mostrando fases no vetor e no hospedeiro vertebrado.



Fonte: REITHINGER *et al.*, 2007. Adaptado.

Durante um repasto sanguíneo e outro, as fêmeas de flebotomíneos se alimentam de açúcares de plantas, período no qual o parasito se desenvolve e migra para as partes mais anteriores do intestino (BATES, 2007). Por um processo

chamado metaciclo-gênese, influenciado por mudanças no pH e depleção de nutrientes, ocorre a diferenciação de promastigotas metacíclicas, as formas infectantes para os hospedeiros vertebrados (BATES, 2009).

As promastigotas metacíclicas são regurgitadas durante o repasto sanguíneo graças a mecanismos como danificação da válvula estomodeal e formação de um *plug* de PSG (*promastigote secretory gel*) (BATES, 2007). Elas são então fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocítico (SMF) – macrófagos teciduais presentes na derme (HANDMAN; BULLEN, 2002; NEVES *et al.*, 2016). O vacúolo parasitóforo se funde com lisossomos, formando um fagolisossomo, onde as promastigotas metacíclicas se diferenciam em amastigotas, formas arredondadas com flagelo internalizado, que se multiplicam, rompem as membranas dos macrófagos e infectam novas células presentes no local ou após disseminação (PEARSON; SOUSA, 1996; REITHINGER *et al.*, 2007).

As leishmânias possuem diversas espécies de reservatórios e vetores, não existindo controle efetivo da transmissão de leishmaniose (PEARSON; SOUSA, 1996; HOTEZ *et al.*, 2004; REITHINGER *et al.* 2007). Como agravante, é esperado que haja falhas no diagnóstico e nas notificações dos casos às autoridades (REITHINGER *et al.*, 2007; ALVAR *et al.* 2012).

Estima-se que, em 2002, tenham ocorrido 51 mil mortes por causa de leishmaniose (WHO, 2004). A Organização Mundial de Saúde também calcula que 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorram em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão; enquanto 70% dos casos de leishmaniose tegumentar ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria (WHO, 2016), colocando o Brasil como país de grande incidência das duas formas da doença.

No Brasil, 3.453 casos de leishmaniose visceral e 19.402 casos de leishmaniose tegumentar foram reportados em 2014, estando 43% e 70% da população em risco de contrair tais doenças, respectivamente (WHO, 2016). Contudo, considerando que a ocorrência real seja maior do que o reportado às autoridades, Alvar e colaboradores (2012) estimam que, no período de 2003 a 2007, a ocorrência de leishmaniose no País tenha sido de 77.000 a 125.900 casos por ano.

1.2 Leishmaniose tegumentar americana (LTA)

Denominada popularmente de úlcera-do-Bauru (NEVES *et al.*, 2016), a LTA, segundo a Organização Mundial de Saúde (2010), 1.5 milhões de novos casos de leishmaniose tegumentar surgem anualmente no mundo todo. São diversas as espécies que causam leishmaniose tegumentar nas Américas, tanto do subgênero *Viannia* quanto do *Leishmania* (PEARSON; SOUSA, 1996; CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014), resumidas na tabela 1.

Tabela 1 – Principais espécies causadoras de Leishmaniose tegumentar nas Américas, suas manifestações clínicas mais comuns e principais locais de ocorrência.

Espécie	Principal forma clínica	Principal distribuição geográfica
<i>L. (V.) braziliensis</i>	Cutânea localizada, mucosa	América do Sul, Central México
<i>L. (V.) panamensis</i>	Cutânea localizada, mucosa	Norte da América do Sul e Sul da América Central
<i>L. (V.) peruviana</i>	Cutânea localizada	Peru
<i>L. (V.) guyanensis</i>	Cutânea localizada	América do Sul
<i>L. (V.) lainsoni</i>	Cutânea localizada	América do Sul
<i>L. (V.) colombiensis</i>	Cutânea localizada	Norte da América do Sul
<i>L. (L.) amazonensis</i>	Cutânea localizada, difusa	América do Sul
<i>L. (L.) mexicana</i>	Cutânea localizada, difusa	América Central, México, Estados Unidos
<i>L. (L.) pifanoi</i>	Cutânea localizada	América do Sul
<i>L. (L.) venezuelensis</i>	Cutânea localizada	Norte da América do Sul
<i>L. (L.) garnhami</i>	Cutânea localizada	América do Sul

Fonte: REITHINGER *et al.* (2007). Adaptado.

As espécies mais importantes no Brasil são *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (L.) amazonensis* (OLIVEIRA; BRODSKY, 2012; BRASIL, 2013). Seus ciclos de transmissão variam de zoonoses a zoonoses sinantrópicas, no caso de *L. (V.) braziliensis*, apresentando tendências de adaptarem-se à transmissão no peridomicílio (ROTUREAU, 2006).

L. (V.) braziliensis é a espécie predominante no Brasil em áreas onde a leishmaniose tegumentar é endêmica, com prevalência baixa no Amazonas, e tem *Lutzomyia wellcomei* como principal vetor, mas *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia*

intermedia têm também grande relevância na sua transmissão (ROTUREAU, 2006; OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012). Seus reservatórios são tanto animais sinantrópicos como silvestres, tendo sido isolada em roedores, felídeos, canídeos e equídeos, sendo esses últimos dois ocorrido no Ceará, onde *Lu. whitmani* é o vetor mais relevante (BRASIL, 2013).

1.2.1 Manifestações clínicas

A LTA tem um espectro de manifestações diferentes, dependendo da espécie do parasito e do estado imunológico do hospedeiro, sendo o diagnóstico diferencial muito importante (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). A LTA tem período de incubação de dois a três meses em média (BRASIL, 2013). Marzochi e Marzochi (1994) dividem as formas de LTA em cinco grandes grupos: grupo subclínico ou leishmaniose cutânea inaparente, grupo cutâneo ou leishmaniose cutânea, grupo mucoso ou leishmaniose mucosa, grupo misto ou leishmaniose mucocutânea associada e grupo linfático ou leishmaniose linfática.

No grupo subclínico, não há desenvolvimento de lesões, embora a intradermorreação de Montenegro seja positiva, e é difícil definir o potencial de progressão da doença (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). A prevalência dessa forma varia de 5% a 39,4% em áreas endêmicas (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014).

A leishmaniose cutânea é subdividida em leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea disseminada (LD) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). A lesão típica da leishmaniose é uma úlcera com bordas em moldura, com baixa parasitemia, de base firme, endurecida, fundo granuloso e indolor (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVEZ, 2014).

Na LCL, forma clássica da doença, uma única lesão se forma no local da picada do flebotomíneo, que se desenvolve de uma pápula que ulcera progressivamente por um período de duas semanas a seis meses (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; REITHINGER *et al.*, 2007). Além da lesão típica, existem manifestações atípicas da doença, associadas ou não a HIV, a maioria causada por *L. (V.) braziliensis*, como lesão na boca, dor intensa nas pernas, nódulo eritematoso, lesões eritematosas pontuadas sem prurido, e lesão vesicular com acúmulo de fluido (MEIRELES *et al.*, 2017). Quando ocorrem recidivas de LCL, denomina-se

leishmaniose recidiva cútis (LRC), com resposta exacerbada ao teste de Montenegro e lesões em formas de pápulas, eritema, descamação, tubérculos ou nódulos na periferia da cicatriz da lesão anterior (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014).

A LD é caracterizada por várias lesões, até centenas, na forma de pequenas pápulas acneiformes, distantes do sítio de inoculação, com intradermorreação de Montenegro positiva (CARVALHO *et al.*, 1994; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). É atribuída a *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis* (CARVALHO *et al.*, 1994; COUPPIÉ *et al.*, 2004; RINCÓN *et al.*, 2009). Em estudo feito na Bahia, pacientes com LD causada por *L. (V.) braziliensis* apresentarem níveis menores de IFN- γ e TNF- α e níveis elevados de IL-10 do que pacientes com LCL, indicando que a resposta imunológica do hospedeiro pode predispô-lo à forma disseminada da doença, além de especificidades da cepa (TURETZ *et al.*, 2002).

No Brasil, a LCD tem como agente etiológico *L. (L.) amazonensis* e é também conhecida como LCD anérgica (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). Os pacientes apresentam lesões múltiplas, não ulceradas, papulares ou nodulares, distantes do sítio de inoculação, teste de Montenegro negativo, sorologia positiva e podem não responder ao tratamento (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). É importante o diagnóstico diferencial, pois as lesões são facilmente confundidas com hanseníase virchowiana (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). Podem ocorrer lesões ósseas (COSTA *et al.*, 2005). O teste de Montenegro negativo é indicativo de que não há resposta imune protetora, com ausência de expressão de IFN- γ , o que também explica a ausência de úlceras nas lesões (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). Pode haver mudança no perfil inflamatório com aumento da expressão de citocinas inflamatórias durante o tratamento, mas não é permanente e não evita recaídas (BOMFIM *et al.* 1996).

Na leishmaniose mucosa (LM), ocorrem lesões internas nas mucosas da orofaringe, geralmente múltiplas, ocorrendo após a cura espontânea ou terapêutica de leishmaniose cutânea, com lesões originais cicatrizadas, ou sem essas lesões, quando se denomina de origem indeterminada (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). Neste caso, considera-se que a lesão cutânea original pode ter sido diminuta ou de cura rápida, não tendo sido notada (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). Pode ainda ser a forma primária da doença, quando a inoculação dos parasitos pelo

flebotômico foi diretamente na mucosa exposta, sendo normalmente uma única lesão externa (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

Nos casos de LM, a intradermorreação de Montenegro é fortemente positiva, estando a LM situada no polo hiperérgico das leishmanioses (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). Há uma hiperexpressão de IFN- γ e TNF- α , citocinas inflamatórias, associada a baixos níveis de IL-10 e TGF- β , indicando que não há compensação da resposta celular do tipo Th1 exacerbada, o que causa danos aos tecidos e baixa parasitemia nas lesões (BACELLAR *et al.*, 2002). As espécies causadoras são majoritariamente do subgênero *Viannia*, sendo *L. (V.) braziliensis* a mais importante, além de *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis* (SANTRICH *et al.*, 1990; OSORIO; CASTILLO; OCHOA, 1998; AMATO *et al.*, 2008), e *L. (L.) amazonensis* (BARRAL *et al.*, 1991).

Os sintomas normalmente começam como inflamação nasal e congestão, evoluindo para ulceração da mucosa nasal e perfuração do septo, caracterizando o nariz de tapir, podendo também envolver lábios, bochechas, palatos, faringe, laringe, traqueia e genitália (PEARSON, SOUZA, 1996; CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). As mortes são incomuns, mas ocorre grande desfiguração facial, o que causa morbidade, além de complicações respiratórias (PEARSON; SOUZA, 1996; AMATO *et al.*, 2008). O tratamento com antimônio pode ser insatisfatório, com recidivas frequentes (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014), principalmente em pacientes portadores de HIV, transplantados e usuários crônicos de corticosteroides (AMATO *et al.*, 2008).

A leishmaniose mucocutânea associada ocorre quando há, ao mesmo tempo, lesões mucosas e cutâneas, podendo elas acontecerem concomitantemente ou a lesão mucosa tendo originado-se da continuidade de lesão cutânea (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). O teste de Montenegro e sorologia são positivos, sendo as espécies causadoras e as complicações as mesmas da LM (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; PEARSON; SOUZA, 1996).

A leishmaniose linfática é caracterizada por linfagite ou linfadenopatia, acompanhada ou não de lesões de qualquer um dos outros grupos, com teste de Montenegro podendo ser negativo e sorologia positiva (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). No Ceará, 77% dos casos com diagnóstico de confirmação parasitológica tiveram linfadenopatia associada às lesões cutâneas causadas por *L. (V.)*

braziliensis, quadro chamado de leishmaniose bubônica (SOUSA *et al.*, 1995). O surgimento da linfadenopatia acontece mais comumente depois do surgimento da lesão, mas também pode acontecer antes ou concomitantemente (HARMS *et al.*, 2005).

1.2.2 Tratamento

Não existem ainda fármacos profiláticos ou vacina para as leishmanioses, e poucos são os medicamentos aprovados (GILLESPIE *et al.*, 2016). Os medicamentos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, sendo o mais usado o antimoniato de meglumina (Glucantime®), e existindo, entre outros, a anfotericina e a pentamidina como tratamentos alternativos (CROFT; SHYAM; FAIRLAMB, 2006; AMATO *et al.*, 2008). Infelizmente, são diversos os efeitos colaterais do uso dos antimoniais, como falência hepática, pancreatite, anorexia, febre, artralgia, mialgia, náusea, vômito, dor no local da injeção intramuscular, cardiotoxicidade e morte súbita (PEARSON; SOUZA, 1996; AMATO *et al.*, 2008).

O mecanismo de ação dos antimoniais é relativamente incerto. No entanto, é certo que a forma pentavalente do antimonial é reduzida para trivalente, promovendo fragmentação do DNA da amastigota, interferindo com sua bioenergética, inibindo glicólise e β -oxidação de ácidos graxos e provocando efluxo de tripanotona e glutatona, sendo as promastigotas menos sensíveis que as amastigotas (CROFT; SHYAM; FAIRLAMB, 2006; AMATO *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2010). Além disso, foi mostrado que o tratamento com antimoniato de meglumina é capaz de aumentar a fagocitose, além de induzir a produção de ânion superóxido, TNF- α e, conseqüentemente, óxido nítrico por células do SMF, apresentando efeito imunomodulador (MUNIZ-JUNQUEIRA; PAULA-COELHO, 2008; SALDANHA *et al.*, 2012).

Entre os motivos pelos quais o tratamento com antimonial falha, estão doses baixas, tratamento prévio e/ou irregular, quantidade de lesões e peso maior que 68 kg (RODRIGUES *et al.*, 2006). O mal uso dos antimoniais, principalmente por causa de tratamentos irregulares e incompletos, expõe os parasitos a pressões seletivas que guiam a evolução de resistência, que pode desenvolver-se também a

novos medicamentos antileishmania conforme eles são introduzidos (CROFT; SHYAM; FAIRLAMB, 2006).

Os mecanismos pelos quais as leishmânias resistem aos antimoniais são diversos, como diminuição da redução da forma pentavalente para a trivalente, aumento de enzimas e precursores de glutatona e tripanotona, ou sequestro e acúmulo do antimonial em vacúolos (CROFT; SHYAM; FAIRLAMB, 2006). Foi demonstrado em *L. amazonensis* que não ocorre diminuição da absorção de antimonial em cepa resistente (BERMAN *et al.*, 1989).

1.3 Resposta imunológica na leishmaniose tegumentar

Ao ser inoculada pela picada do flebotomíneo no hospedeiro invertebrado, as promastigotas metacíclicas são reconhecidas pelo sistema imunológico por meio da imunidade inata. Esta é rápida e inespecífica, crucial para o controle da replicação inicial e disseminação de agentes infecciosos, que ocorre quando o organismo é exposto a eles pela primeira vez (LE BON; TOUGH, 2002; UTHAISANGSOOK *et al.*, 2002).

O reconhecimento de estímulos antigênicos na primeira vez se dá pela presença de moléculas em sua superfície, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), os quais são reconhecidos por receptores como os do tipo *toll* (TLR), receptores de manose e integrinas (OFEK *et al.*, 1995; MEDZHITOV; JANAWAY, 1997). Membros dessa família de receptores têm um papel crucial para a indução da resposta inata (BACHMANN; KOPF, 2002). O lipofosfoglicano (LPG) e o gp63 da superfície de *Leishmania*, entre outras moléculas, funcionam como PAMPs, (OFEK *et al.*, 1995). O LPG é particularmente importante na resistência ao sistema complemento e oxidação, assim como na inibição da formação do fagolisossomo em macrófagos (SPÄTH *et al.*, 2003). Além disso, fatores como a saliva dos flebotomíneos também têm papel importante no estabelecimento do parasito no hospedeiro vertebrado (SAMUELSON *et al.*, 1991; TEIXEIRA *et al.*, 2005a).

Os fagócitos, células que engolfam microrganismos, são divididos em neutrófilos, monócitos/macrófagos e eosinófilos, sendo os dois primeiros de maior relevância (UTHAISANGSOOK *et al.*, 2002). A fagocitose se dá a partir do

reconhecimento de PAMPs, sem a necessidade de opsonização (OFEK *et al.*, 1995), mas fagócitos também são capazes de reconhecer opsoninas, como anticorpos e componentes do sistema complemento (UTHAISANGSOOK *et al.*, 2002).

Os neutrófilos, também chamados de granulócitos polimorfonucleares (PMN) parte integrante da imunidade inata, são os primeiros a chegarem no local da infecção e a agirem contra os organismos invasores (UTHAISANGSOOK *et al.*, 2002; NATHAN, 2006; LASKAY; ZANDBERGEN; SOLBACH, 2008). Eles contêm uma grande variedade de receptores do tipo *toll*, como TLR1, TLR2 e TLR4 (MUZIO *et al.*, 2000). Foi demonstrado por Laufs *et al.* (2002) que a fagocitose de *L. major* por neutrófilos pode ser realizada independente de opsonização, possivelmente reconhecida pelo receptor CR3.

Os PMNs usam diversos mecanismos para matar microrganismos. Após a fagocitose, ocorre exposição destes à enzimas líticas presentes em grânulos citoplasmáticos, os quais se fundem ao fagossomo, e espécies reativas de oxigênio, por meio de explosão respiratória (NATHAN, 2006; SEGAL, 2005; MOLLINEDO *et al.*, 2010). Além disso, são capazes de formar uma rede de fibras formadas de DNA, histonas e enzimas microbicidas, chamada NET (*neutrophil extracellular trap*), que atua controlando a disseminação de patógenos e destruindo-os (BRINKMANN *et al.*, 2004). Tal mecanismo se mostrou eficiente no controle e morte de promastigotas de *L. amazonensis* (GUIMARÃES-COSTA *et al.*, 2009).

De Moura e colaboradores (2005) mostraram que, em camundongos BALB/c, *L. braziliensis* induz constante recrutamento de neutrófilos para o sítio de inoculação. Novais *et al.* (2009) demonstraram que neutrófilos são importantes no controle da infecção, incluindo sua associação a macrófagos, mostrando que neutrófilos de camundongos BALB/c inoculados com *L. braziliensis* apresentam menor carga parasitária. A atividade microbicida se apresenta dependente de TNF- α , elastase neutrofílica e produção de superóxidos (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004; AFONSO *et al.*, 2008; NOVAIS *et al.* 2009). A elastase induz ativação de macrófagos e secreção de TNF- α (FADOK *et al.*, 2001).

Os neutrófilos também têm importante função de sinalização no sistema imunológico. Eles são capazes de secretar MIP-1 β (ZANDBERGEN *et al.*, 2004), catepsina G e azurocidina/CAP37 (CHERTOV *et al.*, 1997), que atuam no recrutamento de leucócitos mononucleares e outros neutrófilos. Diversos estudos

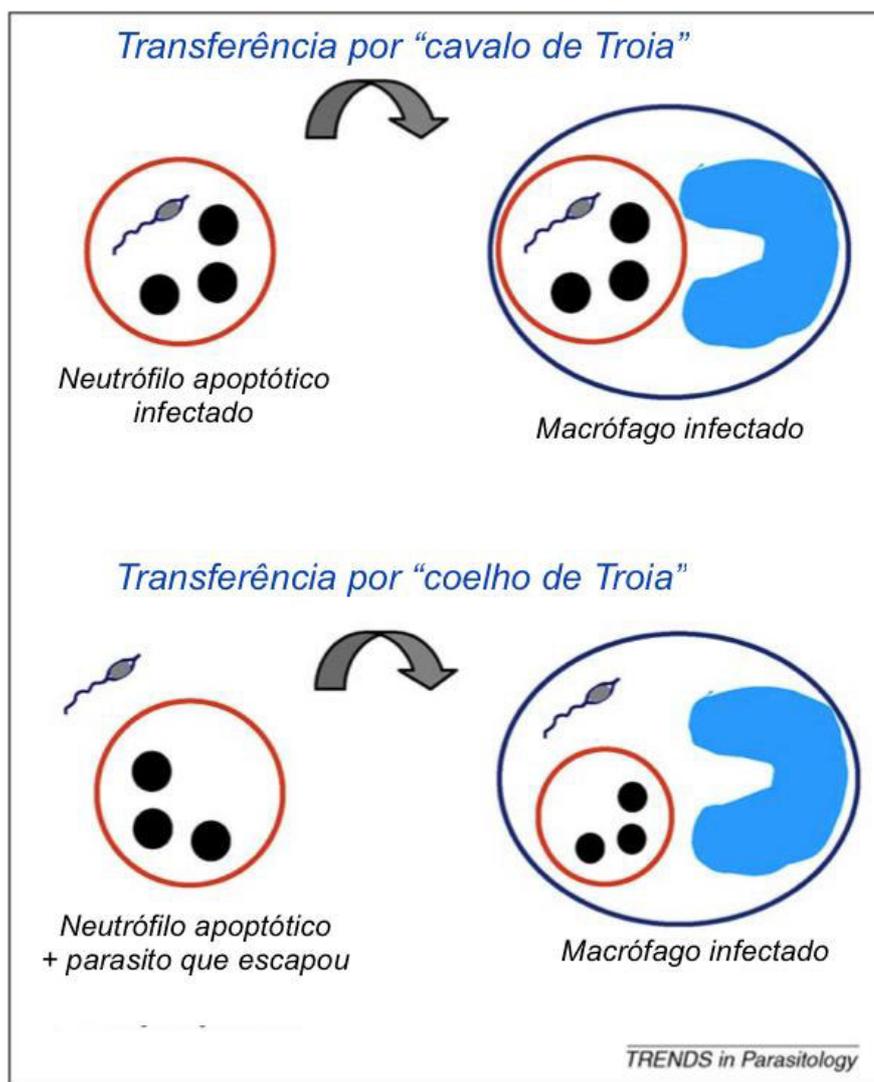
têm mostrado que a produção de IL-12 por neutrófilos frente à infecção é de grande relevância, classificando-os como ponte entre a imunidade inata e adquirida (DENKERS; DEL RIO; BENNOUNA, 2003). IL-12, por sua vez, estimula a produção de outras citocinas inflamatórias, como IFN- γ , aumentando a atividade citotóxica de células *natural killers* (NK) e modulando a resposta imune adquirida do tipo Th1, associada à resistência a parasitos intracelulares, inclusive *Leishmania* (WANG; FRANK; RITZ, 2000; TRINCHIERI, 2003; KAYE; SCOTT, 2011). Há também a produção de ligantes de CCR5 e CCL20, quimiocinas que recrutam células dendríticas (BENNOUNA *et al.*, 2003).

Mesmo que os neutrófilos tenham um papel importante e apresentem diversos mecanismos para a eliminação de leishmânias, substâncias quimiotáticas que atraem neutrófilos foram encontradas em culturas de *Leishmania major*, além de induzir a secreção de quimiocinas para recrutamento de neutrófilos, como IL-8, logo nas primeiras horas da infecção (MÜLLER *et al.*, 2001; AGA *et al.*, 2002; LAUFS *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2006). Por mais que tenham papel no controle das leishmânias, os neutrófilos têm grande relevância para o estabelecimento da infecção.

Ribeiro-Gomes *et al.* (2004) demonstraram que a co-inoculação de *L. major* com neutrófilos mortos causou efeitos diferentes em camundongos BALB/c, susceptíveis à infecção, e C57BL/6, resistente. Enquanto aquele teve aumentada carga parasitária, um maior número de macrófagos parasitados e mais amastigotas por macrófago, a presença de neutrófilos apoptóticos neste promoveu exatamente o contrário. Isso indica que o papel de neutrófilos no estabelecimento da infecção por *Leishmania* é dependente do modelo usado, de espécie e cepa do parasito (RITTER; FRISCHNECHT; ZANDBERGEN, 2009).

Foi mostrado também que os neutrófilos podem servir de hospedeiros temporários para promastigotas, servindo de porta de entrada silenciosa em macrófagos por meio de dois mecanismos (Figura 2), denominados “cavalo de Troia” e “coelho de Troia” (AGA *et al.*, 2002; PETERS *et al.*, 2008).

Figura 2 – Interação do complexo *Leishmania*-neutrófilo servindo como fonte de infecção para macrófagos, pelos modelos de transferência por cavalo de Troia e coelho de Troia.



Fonte: RITTER; FRISCHNECHT; ZANDBERGEN, 2009.
Adaptado.

No mecanismo do cavalo de Troia, as promastigotas são ingeridas indiretamente pelos macrófagos, estando elas dentro de um neutrófilo apoptótico, e só depois iriam diferenciar-se em amastigotas (ZANDBERGEN *et al.*, 2004). No caso do coelho de Troia, as promastigotas saíam dos neutrófilos logo antes da ingestão pelos macrófagos. Nos dois casos, as promastigotas utilizam o PMN de hospedeiro temporário até a chegada de macrófagos (PETERS *et al.*, 2008).

Macrófagos são células do sistema mononuclear fagocítico (SMF) presentes em tecidos, diferenciadas dos monócitos, e apresentam dois fenótipos, M1 e M2, sendo o segundo subdividido em M2a, M2b e M2c (ROJAS *et al.*, 2015). O perfil M1 é ativado por INF- γ e possui ação altamente fagocítica e pró-inflamatória, como secreção de IL-12, CXCL10 (WADDELL *et al.*, 2010; ROJAS *et al.*, 2015). O perfil M2a é altamente anti-inflamatório e atua no reparo de tecidos, sendo capazes de depositar matriz extracelular e expressar TGF- β , inibindo também expressão de citocinas inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , enquanto M2b e M2c são reguladores, expressam IL-10, limitando a progressão da inflamação (MOSSER; EDWARDS, 2008; ROJAS *et al.*, 2015).

A porta de entrada da *Leishmania* diretamente em macrófagos, suas células hospedeiras alvo, é importante para a determinação do curso da infecção. Os macrófagos possuem vários receptores que promovem a fagocitose de leishmânias, como receptores de manose, receptores do tipo *toll*, receptores Fc e receptores CR1 e CR3, este último não iniciando produção de H₂O₂, oxidante que atua na morte de microrganismos fagocitados, o que aumenta a sobrevivência dos parasitos (WILSON; PEARSON, 1988; MUZIO *et al.*, 2000; HANDMAN; BULLEN, 2002; MUNIZ-JUNQUEIRA; PAULA-COELHO, 2008; LIU; UZONNA, 2012). Quanto às amastigotas, Wanderley *et al.* (2006) demonstraram que *L. amazonensis* tem fosfatidilserina em sua membrana e imita células apoptóticas, não induzindo ativação de macrófagos quando fagocitada.

Os macrófagos são grandes responsáveis por destruição de parasitos, uma vez fagocitados, e para isso utilizam substâncias como óxido nítrico (NO), produzidas pelo perfil pró-inflamatório M1, sob estimulação de IFN- γ (LIU; UZONNA, 2012; ROJAS *et al.*, 2015). No entanto, mesmo que macrófagos fagocitem eficientemente as leishmânias, elas são capazes de inibir produção de IL-12, além de aumentar a expressão de IL-10 e TGF- β , características do fenótipo M2a e M2b, ideais para a sobrevivência do parasito (MOSSER; EDWARDS, 2008; BHARDWAJ *et al.*, 2010; FILARDY; PIRES; DOSREIS, 2011; LIU; UZONNA, 2012).

A inibição de IL-12, por si, já é associada à diminuição da produção de IFN- γ por outras células, dificultando mais ainda a ativação de macrófagos para destruição dos parasitos (WANG; FRANK; RITZ, 2000; TRINCHIERI, 2003; KAYE; SCOTT, 2011). A presença, portanto, de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, IL-

4, PGE₂ e TGF-β, são características de susceptibilidade de macrófagos à proliferação de *Leishmania* (MOSSER; EDWARDS, 2008; COSTA *et al.*, 2011; FILARDY; PIRES; DOSREIS, 2011). As leishmânias também são capazes de alterar a expressão de quimiocinas por macrófagos, modificando de que forma a migração de células imunes se dá ao local de infecção, e diferentes cepas induzem produção de diferentes quimiocinas (TEIXEIRA *et al.*, 2005b; TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Existem também cepas de *Leishmania* que são resistentes ao NO, resistência esta que pode estar associada à resistência ao antimônio (SOUZA *et al.*, 2010). Além disso, a resistência ao NO também é associada à severidade da doença (GIUDICE *et al.*, 2007).

Os eosinófilos são células do sistema imunológico que podem servir como apresentadores de antígeno, ativar neutrófilos, basófilos e mastócitos, além de modular respostas do tipo Th1 e Th2 e promover maturação de células dendríticas (RODRÍGUEZ; WILSON, 2014). Estudos mostram que eosinófilos apresentam papéis na infecção por *Leishmania* sp., mas não costumam ser considerados por estarem em baixos números (RODRÍGUEZ; WILSON, 2014).

Normalmente, linfócitos tendem a ser mais associados à resposta imune adaptativa, mas existem populações de células linfoides inatas (WALKER; BARLOW; MCKENZIE, 2013). Essas células possuem vários papéis, como secreção de citocinas e atividade citotóxica, entre outras, regulando a resposta imunológica, inflamação e homeostase (TEIXEIRA *et al.*, 2006; BOGDAN, 2012; WALKER; BARLOW; MCKENZIE, 2013).

Dentre as células linfoides inatas, as células NK (*natural killers*) atuam contra infecções de patógenos intracelulares, apresentando atividade citotóxica e secreção de granzimas, perforinas e IFN-γ (WALKER; BARLOW; MCKENZIE, 2013). A atividade citotóxica das células NK quanto a macrófagos infectados com *Leishmania* é irrelevante, já que células mieloides são resistentes à lise provocada por esse tipo celular, tendo importância no papel de sinalização (PRAJEETH *et al.*, 2011). O IFN-γ produzido por células NK é responsável pela ativação clássica de macrófagos na imunidade inata, e tal papel é assumido posteriormente por células Th1 (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Células NK são recrutadas para o local da infecção pela secreção de CCL2 por macrófagos que fagocitaram leishmânias (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Em

infecções por *L. major*, células NK correspondem a, aproximadamente, 1% dos leucócitos no infiltrado inflamatório após 10 horas da infecção (MÜLLER *et al.*, 2001).

1.4 Experimentação *in vivo* de infecção por *L. (V.) braziliensis* e o modelo da bolsa de ar subcutânea

L. (V.) braziliensis é a espécie mais importante causadora de leishmaniose tegumentar nas Américas (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014), No entanto, *L. (V.) braziliensis* apresenta limitações para seu estudo, como a difícil manutenção de culturas axênicas em condições laboratoriais (NIÑO; CAMACHO, 2005).

Os camundongos da linhagem BALB/c também são de difícil uso para estudos crônicos da doença. Tal linhagem apresenta resposta imune adaptativa de perfil Th1 contra *Leishmania (Viannia)* sp., caracterizado por citocinas pró-inflamatórias, controlando a infecção e promovendo cura espontânea das lesões (DEKREY; LIMA; TITUS, 1998; ROCHA *et al.*, 2007). No entanto, ainda é possível estudar resposta inflamatória aguda nesses animais. Outros modelos, como o hamster sírio, *Mesocricetus auratus*, podem ser mais apropriados para estudos crônicos (GOMES-SILVA *et al.*, 2013; MEARS *et al.*, 2015).

O modelo da bolsa de ar foi desenvolvido inicialmente por Selye (1953), para estudar os mecanismos da hidrocortisona na resistência dos tecidos a agressões, utilizando o óleo de cróton como estímulo. Uma grande vantagem que este modelo de inflamação *in vivo* oferece é a criação de um ambiente delimitado por uma estrutura que recobre o limite interno semelhante a uma membrana sinovial. A formação desta cavidade permite a coleta e a análise fenotípica das células que migram em resposta a uma pequena quantidade de estímulo.

Alguns trabalhos têm demonstrado a utilidade do modelo da bolsa de ar também na avaliação da resposta inflamatória induzida por *Leishmania* (MATTE; OLIVER, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2005a; TEIXEIRA *et al.*, 2005b). A utilização deste modelo possibilitou a detecção de diferenças na resposta inflamatória inicial e produção de citocinas e quimiocinas induzida entre *L. major* e *L. donovani* ou entre

cepas de *L. braziliensis* em camundongos (MATTE; OLIVER, 2002; TEIXEIRA et al., 2005a).

2 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose tegumentar é um sério problema de saúde, tanto no Velho quanto no Novo Mundo. Um número significativo de pessoas são infectadas e têm anos de vida ajustados à incapacidade por causa de morbidade causada pela doença (WHO, 2004). Mais pessoas ainda estão em risco de serem infectadas, principalmente com a tendência dos ciclos de transmissão tornarem-se cada vez mais urbanizados, com a adaptação do vetor ao ambiente peridomiciliar (MOLYNEUX, 2003; ROTUREAU, 2006).

L. (V.) braziliensis é o agente etiológico mais importante da leishmaniose tegumentar no Brasil, e é capaz de causar tanto a forma cutânea localizada da doença, como as manifestações mucosas, tidas como as mais graves, que causam mais complicações e morbidades. No entanto, são muito mais frequentes os estudos feitos com *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major*, por causa de dificuldades de manutenção de *L. (V.) braziliensis* em laboratório e ausência de modelos experimentais que mimetizem a doença humana. Logo, há necessidade de maior investigação sobre a reação inflamatória causada por essa espécie de *Leishmania*.

A resposta imunológica do hospedeiro ao parasito nos momentos iniciais da infecção são determinantes para o controle do parasito ou estabelecimento da infecção e curso da doença. Contudo, tais estudos em humanos são extremamente difíceis, já que a picada dos flebotomíneos pode, muitas vezes, passar despercebida, e os pacientes só procuram ajuda médica quando a infecção já está instalada, e a lesão, formada.

Como agravante, não há controle efetivo ao vetor ou medidas imunoproláticas, como vacinas ou fármacos profiláticos, para prevenção das leishmanioses, e os tratamentos vigentes são ineficientes e não práticos, apresentando vários efeitos colaterais sérios e alta desistência por parte dos pacientes que têm que se deslocar para os grandes hospitais em centros urbanos para conseguir tratamento. A falha terapêutica está altamente associada com o surgimento de cepas de *Leishmania* resistentes aos fármacos utilizados, o que é especialmente preocupante no caso de pacientes imunossuprimidos, como os transplantados e portadores de HIV.

Este estudo, portanto, tem o intuito de esclarecer mecanismos utilizados pelos parasitos resistentes para sua melhor sobrevivência no hospedeiro, uma vez que estes conhecimentos podem ter implicações futuras no desenho mais racional de novas estratégias terapêuticas. Para tanto, serão avaliadas as diferenças no recrutamento leucocitário nas horas iniciais da infecção por duas cepas de *L. (V.) braziliensis*, incluindo uma cepa resistente ao tratamento com antimonial pentavalente.

3 OBJETIVO

Comparar o perfil celular inflamatório na fase aguda da infecção induzida por duas cepas de *Leishmania braziliensis*, uma resistente e outra susceptível ao tratamento com Glucantime®, por meio de análise de número e tipos celulares dos leucócitos recrutados após estimulação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c adultos, entre 2 e 6 meses de idade, tanto machos quanto fêmeas, adquiridos do biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade de Campinas (CEMIB/Unicamp). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (DPML/UFC) à temperatura ambiente, com ração e água à vontade. O trabalho foi aprovado como parte de um projeto maior, denominado “EFEITO DE CXCL10 EM CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM CEPA DE LEISHMANIA BRAZILIENSIS REFRATÁRIA AO ANTIMÔNIO”, pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC), sob o número 78/2013, estando de acordo com o Código Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2 Parasitos

As cepas utilizadas de *L. braziliensis* foram a Thor (gentilmente cedida pela Dra. Alda Cruz, FIOCRUZ-RJ), susceptível ao tratamento com antimônio, e LTCP393 (gentilmente cedida pelo Prof. Roque Pereira Almeida, Universidade Federal de Sergipe), apresentada na literatura como resistente ao antimônio e NO (COSTA *et al.*, 2011). A virulência dos parasitos foi mantida através de passagem regular em hamster dourado. Os parasitos foram cultivados a 25 °C em meio N.N.N. contendo Schneider suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado (SBF), 2% de urina humana estéril, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Para os experimentos, foram utilizadas promastigotas com até 5 passagem de cultivo.

4.3 Bolsa de ar subcutânea

As bolsas de ar subcutâneas foram realizadas com base no protocolo descrito por Müller *et al.* (2001). Sob anestesia com tiletamina e zolazepan, foram injetados 3 ml de ar estéril, obtido de fluxo laminar, no dorso do animal. Logo após a

injeção do ar, a seringa foi retirada, tendo sido a agulha mantida no lugar, e encaixada nesta uma segunda seringa, com 10^7 promastigotas de *L. braziliensis* (um grupo com a cepa Thor, e outro com a LTCP393) suspensas em 200 μ l de salina estéril. Para o grupo controle, foram injetado apenas 200 μ l de salina estéril.

4.4 Desenho experimental

Foram realizados dois experimentos independentes para obtenção dos resultados. Em cada grupo, foi utilizado um total de 20 animais, divididos em 7 para cada cepa avaliada e 6 para o controle. Após 12 horas, os animais foram eutanasiados com doses inalatórias letais de halotano em câmara hermética. Em seguida, 5 ml de salina estéril foram utilizados para a lavagem do interior de cada bolsa de ar, aspirando-se de volta entre 3 e 4 ml do exsudato inflamatório. As amostras foram centrifugadas a 1000 rpm a 4 °C por 10 min. As células do sedimento foram ressuspensas em 500 μ l de PBS + BSA 5%. A contagem total de leucócitos foi feita em câmara de Neubauer, após coloração com solução de Turk. Para a confecção de lâminas, parte da amostra ressuspensa passou por centrífuga (Cytospin) a 500 rpm por 5 minutos. A coloração foi feita com Panótico®, e a contagem diferencial feita sob microscópio óptico em objetiva de imersão.

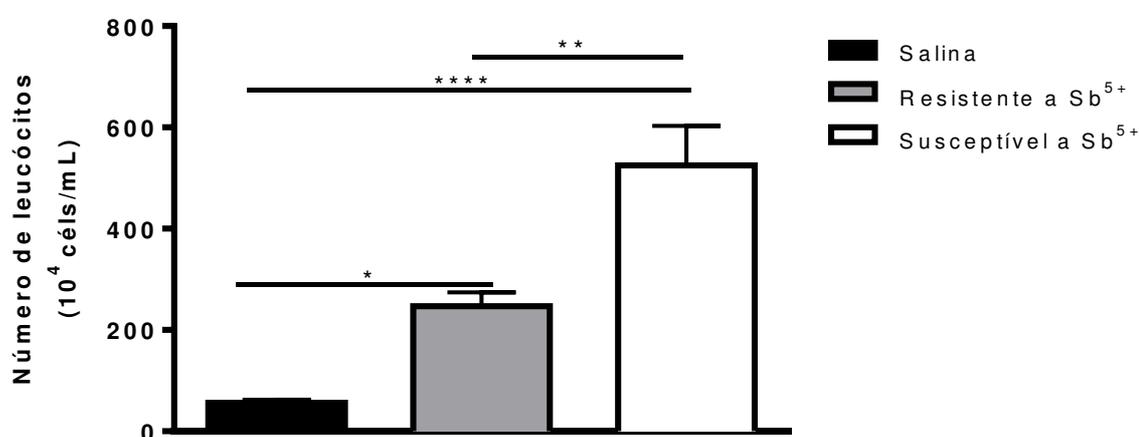
4.5 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0, expressos como média \pm erro padrão da média. Para verificar a significância estatística entre dois grupos independentes, foi utilizado o teste *t*. As comparações entre múltiplos grupos foi feita por teste paramétrico ANOVA, com pós-teste Bonferroni. Foram considerados apresentando diferença significativa dados com valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados da contagem total de leucócitos podem ser observados no Gráfico 1. O recrutamento leucocitário estimulado pela presença da cepa Thor, susceptível ao antimônio, foi definitivamente mais alto ($525 \pm 77,76 \times 10^4$ células/ml) do que o promovido pela LTCP393, resistente ao antimônio ($246,7 \pm 27,88 \times 10^4$ células/ml; $p < 0,01$).

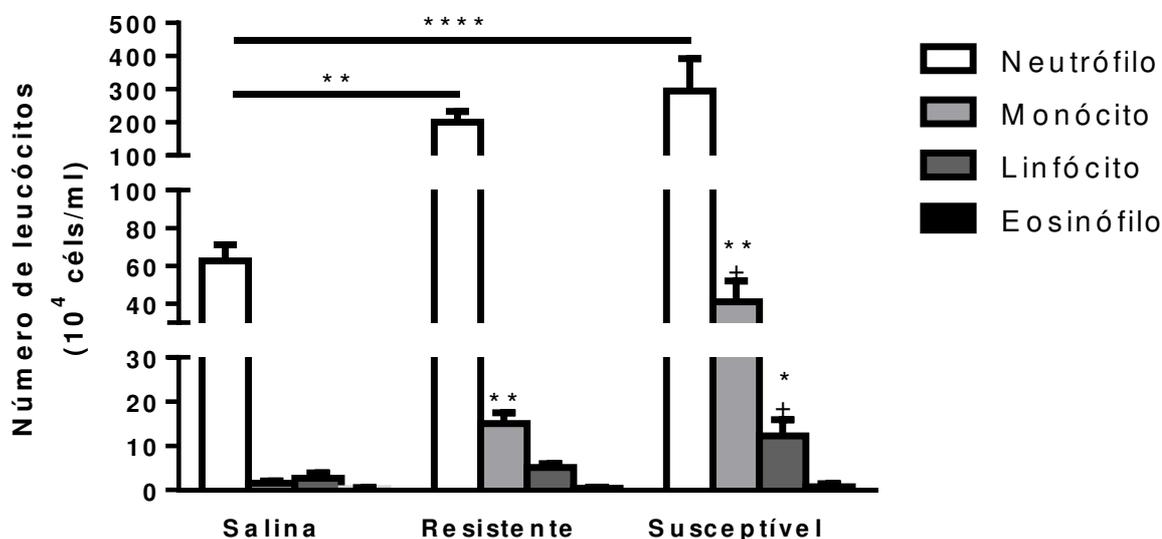
Gráfico 1 – Contagem total de leucócitos no exsudato inflamatório após estímulo com cepa resistente e cepa susceptível ao antimônio.



Fonte: elaborado pelo autor. **** $p < 0,0001$ = significância entre o número de leucócitos recrutados pela cepa susceptível vs salina; ** $p < 0,01$ = significância entre o número de leucócitos recrutados pela cepa resistente vs susceptível; * $p < 0,05$ = significância entre o número de leucócitos recrutados pela cepa resistente vs salina. Sb^{5+} = Antimonial pentavalente.

A contagem diferencial de leucócitos também gerou resultados diferentes para as duas cepas analisadas (Gráfico 2). A diferença no número total de leucócitos recrutados pelas duas cepas não se refletiu em todos os tipos celulares, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os neutrófilos recrutados. Só foi notado recrutamento maior induzido pela cepa sensível para macrófagos ($41,09 \pm 10,97 \times 10^4$ células/ml; $p = 0,0213$) e linfócitos ($12,22 \pm 3,654 \times 10^4$ células/ml; $p = 0,0498$), em relação à resistente (macrófagos: $15,05 \pm 2,468 \times 10^4$ células/ml; linfócitos: $5,061 \pm 0,8926 \times 10^4$ células/ml).

Gráfico 2 – Contagem diferencial de leucócitos recrutados nos grupos com salina, com cepa resistente e com cepa susceptível.



Fonte: elaborado pelo autor. Para neutrófilos, houve diferença significativa entre os recrutados pela cepa resistente e a salina (** $p < 0,01$), e os recrutados pela cepa susceptível e a salina (**** $p < 0,0001$), mas sem diferença das cepas entre si. Quanto aos macrófagos, diferença significativa foi encontrada da cepa resistente comparada à salina (** $p = 0,0011$), da susceptível comparada à salina (** $p = 0,0069$) e entre as cepas (+ $p = 0,0213$). Só se pode aferir diferença significativa entre o linfócitos recrutados pela cepa susceptível, tanto com a salina (* $p = 0,0376$) quanto com a cepa resistente (+ $p = 0,0498$). Não houve diferença significativa no recrutamento de eosinófilos em nenhum grupo.

6 DISCUSSÃO

Os momentos iniciais da infecção são críticos para o controle da proliferação de *Leishmania*, tendo em vista que a contenção dos parasitos nos momentos iniciais da infecção está relacionada a fenótipos de resistência (LASKAY *et al.*, 1995). Neste trabalho, o recrutamento de leucócitos totais promovido pela cepa resistente ao antimônio se mostrou duas vezes menor do que o promovido pela cepa susceptível. Os dois grupos também apresentaram diferença quando comparados à salina. O fato de que a cepa resistente promove um recrutamento menor de leucócitos para o sítio de inoculação pode indicar que ela é menos notada pelo sistema imunológico. O baixo recrutamento, então, pode servir de mecanismo de escape para o parasito, que, ao ser menos detectado e, conseqüentemente, contido, teria maior chance de ser bem sucedido no estabelecimento da infecção.

Cepas de uma mesma espécie de *Leishmania* podem apresentar diferentes formas de imunomodulação no hospedeiro, gerando diferentes expressões de citocinas e quimiocinas (TEIXEIRA *et al.*, 2005b; COSTA *et al.*, 2011). Teixeira *et al.* (2005b) demonstraram que a diferença na expressão de quimiocinas por duas cepas com patogenicidade diferenciada de *L. (V.) braziliensis* estava relacionada com diferente recrutamento, quantitativa e qualitativamente, já nas primeiras horas após a infecção.

No presente trabalho, não houve diferença significativa entre o número de neutrófilos e eosinófilos recrutados pelas duas cepas. No entanto, a cepa resistente apresentou menor recrutamento tanto de macrófagos (2,7 vezes menor) quanto de linfócitos (2,4 vezes menor) comparado à cepa susceptível. Como mencionado anteriormente, os macrófagos são células hospedeiras para *Leishmania* (PEARSON; SOUSA, 1996). O recrutamento menor de macrófagos induzido pela cepa resistente, inicialmente, indica que, ao mesmo tempo que são menos células do sistema imune para controlar a infecção, a cepa resistente teria à sua disposição menos células hospedeiras. No entanto, as leishmânias são capazes de usar neutrófilos como hospedeiros temporários até a chegada dos macrófagos (AGA *et al.*, 2002; PETERS *et al.*, 2008). Foi demonstrado que as promastigotas de *Leishmania* são capazes de serem fagocitadas por neutrófilos sem ativá-los (LAUFS *et al.*, 2002; ZANDBERGEN *et al.*, 2006). A entrada de *L. major* independente de opsonização é silenciosa

(LAUFS *et al.*, 2002). Zandbergen *et al.* (2006) demonstraram que promastigotas apoptóticas, recobertas de fosfatidilserina, induzem a produção de TGF- β e PGE₂, citocina anti-inflamatória, e auxiliam na sobrevivência das promastigotas virulentas, além de inibirem secreção de TNF- α .

Quando as leishmânias já estão estabelecidas nos neutrófilos, são capazes de adiar a apoptose espontânea destas células, mantendo-os viáveis até que os macrófagos cheguem no local da infecção (AGA *et al.*, 2002; PETERS *et al.*, 2008). Isso é possível pois não há promoção de explosão respiratória nem liberação de grânulos por neutrófilos, o que manteria a *Leishmania* viva (MOLLINEDO *et al.*, 2010), além de existir indução de neutrófilos a produzirem MIP-1 β , citocina quimiotática para macrófagos (ZANDBERGEN *et al.*, 2004).

Ao chegarem no sítio inflamatório, os macrófagos induzem a apoptose de neutrófilos contendo as promastigotas e os fagocitam (RITTER; FRISCHNECHT; ZANDBERGEN, 2009). Tal processo não induz ativação dos macrófagos, aumentando a expressão de TGF- β , além de inibirem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α (MEAGHER *et al.*, 1992; FADOK *et al.*, 1998; AFONSO *et al.*, 2008).

Interessante chamar atenção para o número aumentado de neutrófilos, pois, como sugeriram Zandbergen e colaboradores (2004), essas células servem de porta de entrada silenciosa para a *Leishmania* nos macrófagos, mecanismo denominado de “cavalo de Troia”. Além disso, algumas promastigotas podem escapar do neutrófilo logo antes da sua ingestão por macrófagos, mecanismo denominado de “coelho de Troia” (PETERS *et al.*, 2008).

Pode-se sugerir, no presente estudo, que a interação de macrófagos com neutrófilos apoptóticos, além de servir como entrada silenciosa, também poderia ser responsável pela carga parasitária aumentada na infecção por LTCP393 (COSTA *et al.*, 2011), tendo essa relação já sido demonstrada para *L. amazonensis* (AFONSO *et al.*, 2008). Costa *et al.* (2011) mostraram que, em comparação com cepa susceptível ao antimônio, uma cepa resistente apresentou carga parasitária maior na lesão. O mesmo ocorreu para cepa de *L. chagasi* resistente ao NO (SANTOS *et al.*, 2012).

Se isso acontecer, pode ser vantajoso para a cepa resistente recrutar menos macrófagos no início da infecção, dando mais tempo para que ela se

estabeleça em neutrófilos. Por causa da existência desses mecanismos por parte dos neutrófilos, o recrutamento desse tipo celular pela cepa resistente similar ao da cepa susceptível pode significar que o papel inicial dos neutrófilos na infecção com a cepa resistente talvez esteja favorecendo mais o estabelecimento da *Leishmania* do que efetivamente controlando a infecção.

Associado a esse fato, ainda observou-se o menor recrutamento de macrófagos para o exsudato, que pode estar relacionado com o LPG de superfície do parasito. Foi demonstrado que o LPG está relacionado com a redução da migração transendotelial de monócitos, por conta de bloqueio da expressão de E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 (LO *et al.*, 1998). Como no presente trabalho não foi feita análise histopatológica do tecido da bolsa de ar, só se pode especular.

O número reduzido de macrófagos no início da infecção, apesar de significar, a priori, menos células hospedeiras para os parasitos, não se apresenta como um problema tão grande. Como descrito por outros autores, existe uma tendência à inversão da proporção neutrófilos/macrófagos apresentada neste trabalho. A população de macrófagos aumenta, aproximadamente, em 50% após 48 h de infecção com *L. donovani* (MATTE; OLIVIER, 2002), e essas células já se apresentam em maior número que os neutrófilos no tecido que reveste a bolsa de ar inflamatória após 12 h de estimulação com *L. infantum* associada a sangue do hospedeiro e saliva de flebotomíneo (VASCONCELOS *et al.*, 2014). O aumento do número de macrófagos coincide com o tempo pelo qual as promastigotas conseguem manter vivos os neutrófilos que parasitam e, portanto, tais macrófagos encontram, em sua maioria, neutrófilos apoptóticos parasitados, sem promastigotas livres (MÜLLER *et al.*, 2001; AGA *et al.*, 2002; RITTER; FRISCHNECHT; ZANDBERGEN, 2009).

Foi demonstrado que resistência a NO por cepas de *Leishmania* sp. ocorre naturalmente, e é correlacionada à resistência ao antimônio (CARTER *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2012). A resistência ao NO, um dos principais meios de destruição de agentes infecciosos fagocitados por macrófagos, auxilia na sobrevivência do parasito dentro de sua célula hospedeira, evidenciada pela maior carga parasitária (COSTA *et al.*, 2011), além do NO sozinho não ser capaz de controlar a infecção por *L. braziliensis* (CARNEIRO *et al.*, 2016). Em infecções por *L. donovani*, a resistência ao antimônio também está

relacionada com maior virulência (CARTER *et al.*, 2005), e a cepa LTCP393 usada no presente trabalho, causa lesões maiores por conta de indução de expressão de IL-4 (COSTA *et al.*, 2011). Mesmo que o recrutamento menor de macrófagos tenha sido relacionado com lesões menores em modelos imunodeficientes (BARRAL *et al.*, 1991), as formação de lesões maiores por LTCP393 (COSTA *et al.*, 2011), corrobora com a tendência de aumento da população de macrófagos com o tempo.

Houve também um recrutamento significativamente menor de linfócitos por parte da cepa resistente. Trabalhos mostraram que o baixo número de macrófagos infectados no sítio inflamatório, conseqüentemente, não produziria a quimiocina CCL2, responsável por recrutar células NK, macrófagos, e outras células CCR2⁺ (TEIXEIRA *et al.*, 2006; ROJAS *et al.*, 2015), sendo uma possível explicação para o número menor de linfócitos em comparação à cepa susceptível. Além disso, macrófagos inflamatórios são os responsáveis por secreção de CCL2, e a infecção por *Leishmania* não induz ativação desse tipo de macrófago (BHARDWAJ *et al.*, 2010; LIU; UZONNA, 2012; ROJAS *et al.*, 2015).

Entre as células de origem linfoide, as células NK são as que tem importante papel sinalizador na imunidade inata, produzindo IFN- γ , que ativa macrófagos (PRAJEETH *et al.*, 2011). Portanto, um número menor de células NK recrutadas seria um indicador de menor produção de IFN- γ . O baixo número de macrófagos também pode acarretar numa baixa produção de CXCL10, que serve não só para atrair mais macrófagos, mas também para ativar células NK (VESTER *et al.*, 1999; TEIXEIRA *et al.*, 2006).

A depleção de células NK e IFN- γ já foi demonstrada, sendo de grande importância para o perfil de resistência em camundongos C57BL/6 infectados com *L. major* (LASKAY, 1995), apresentando um fenótipo mais similar à susceptibilidade à infecção nesse caso. Em camundongos BALB/c, o baixo número de células NK recrutadas no início da infecção pela cepa LTCP393, usada no presente trabalho, pode ser um dos fatores que leva à formação de lesões maiores e de cura mais lenta nessa linhagem de camundongo, além dos já apresentados, como alta produção de IL-4, por Costa *et al.* (2011). Para confirmar se isso acontece no modelo estudado, tornam-se necessárias outras análises, como avaliação de citocinas e citometria de fluxo para determinação dos tipos celulares presentes no exsudato inflamatório.

7 CONCLUSÕES

A cepa resistente ao tratamento com Glucantime® foi capaz de recrutar menos leucócitos para o local de infecção do que a cepa susceptível. Essa diferença também se dá pelo número inferior de macrófagos e linfócitos presentes no infiltrado inflamatório induzido pela cepa resistente, sugerindo que a cepa resistente elicia uma resposta imunológica mais branda, facilitando sua sobrevivência.

O número similar de neutrófilos recrutados pelas duas cepas indica que estes têm um maior papel no estabelecimento da infecção do que no controle efetivo da *Leishmania*. A presença de poucos macrófagos, além de provavelmente apresentarem um perfil predominantemente anti-inflamatório, está associada ao baixo número de linfócitos no infiltrado inflamatório da bolsa de ar estimulada com a cepa, que tornaria os macrófagos ainda mais favoráveis à infecção e proliferação do parasito. Mais estudos são necessários para confirmar tais achados.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, L. *et al.* Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Journal Of Leukocyte Biology**, [s.l.], v. 84, n. 2, p.389 – 396, 2008.
- AGA, E. *et al.* Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular Parasite *Leishmania major*. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 169, n. 2, p.898-905, 2002.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE** São Francisco, v. 7, n. 5, 2012.
- AMATO, V. S. *et al.* Mucosal leishmaniasis: current scenario and prospects of treatment. **Acta Tropica**, v. 105, n. 1, p. 1 – 9, 2008.
- BACELLAR, O. *et al.* Up-Regulation of Th1-Type Response in Musocal Leishmaniasis Patients. **Infection and Immunity**, Washington DC, v. 70, n. 12, p. 6734 – 6740, 2002.
- BACHMANN, M. F.; KOPF, M. Balancing protective immunity and immunopathology. **Current Opinion in Immunology**, [s.l.], v. 14, p. 413 – 419, 2002.
- BARRAL, A. *et al.* Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* Produces a Wide Spectrum of Clinical Disease. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 44, n. 5, p.536-546, 1991.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal For Parasitology**, [s.l.], v. 37, n. 10, p.1097-1106, 2007.
- BATES, P. A. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. **Current Opinions in Microbiology**, [s.l.], v. 11, n. 4, p. 340-344, 2009.
- BENNOUNA, S. *et al.* Cross-Talk in the Innate Immune System: Neutrophils Instruct Recruitment and Activation of Dendritic Cells during Microbial Infection. **The Journal of Immunology**, [s.l.], v. 171, n. 11, p. 6052 – 6058, 2003.

BERMAN, J. D. *et al.* Biochemistry of Pentostam Resistant *Leishmania*. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 40, n. 2, p.159-164, 1989.

BHARDWAJ, S. *et al.* *Leishmania* Interferes with Host Cell Signaling to Devise a Survival Strategy. **Journal Of Biomedicine And Biotechnology**, [s.l.], v. 2010, p.1-13, 2010.

BOGDAN, C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [s.l.], v. 2, p.1-9, 2012.

BOMFIM, G. *et al.* Variation of Cytokine Patterns Related to Therapeutic Response in Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 94, p. 188 – 194, 1996.

BRASIL. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. 2 ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2013. 180 p.

BRINKMANN, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kills Bacteria. **Science**, [s.l.], v. 303, n. 5663, p. 1532 – 1535, 2004.

CARNEIRO, P. P. *et al.* The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 11, n. 2, p.1-16, 2016.

CARTER, K. C. *et al.* Sodium stibogluconate resistance in *Leishmania donovani* correlates with greater tolerance to macrophage antileishmanial responses and trivalent antimony therapy. **Parasitology**, [s.l.], v. 131, n. 06, p.747-757, 2005.

CARVALHO, E. M. *et al.* Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 56, n. 4, p. 315 – 325, 1994.

CHERTOV, O. *et al.* Identification of Human Neutrophil-derived Cathepsin G and Azurocidin/CAP37 as Chemoattractants for Mononuclear Cells and Neutrophils. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 186, n. 5, p. 739 – 747, 1997.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C R. (Org.). **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. 512 p.

COSTA, A. A. U. M. L. *et al.* Imaging exams of bone lesions in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). **Acta Tropica**, [s.l.], v. 96, p. 9 – 15, 2005.

COSTA, D. L. *et al.* BALB/c Mice Infected with Antimony Treatment Refractory Isolate of *Leishmania braziliensis* Present Severe Lesions due to IL-4 Production. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 5, n. 3, p.1-11, 2011.

COUPPIÉ, P. *et al.* DISSEMINATED CUTANEOUS LEISHMANIASIS DUE TO *LEISHMANIA GUYANENSIS*: CASE OF A PATIENT WITH 425 LESIONS. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s.l.], v. 71, n. 5, p. 558 – 560, 2004.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.111-126, 2006.

DEKREY, G. K.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**, Washington DC, v. 66, n. 2, p. 827 – 829, 1998.

DENKERS, E. Y.; DEL RIO, L.; BENNOUNA, S. Neutrophil Production of IL-12 and other Cytokines during Microbial Infection. **Chemical Immunology and Allergy**, Basel, v. 83, p. 95 – 114, 2003.

FADOK, V. *et al.* Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells In Vitro Inhibit Proinflammatory Cytokine Production Through Autocrine/Paracrine Mechanisms Involving TGF- β , PGE2 and PAF. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 101, n. 4, p. 890, 898, 1998.

FADOK, V. A. *et al.* Differential Effects of Apoptotic Versus Lysed Cells on Macrophage Production of Cytokines: Role of Proteases. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 166, n. 11, p.6847-6854, 2001.

FILARDY, A. A.; PIRES, D. R.; DOSREIS, G. A. Macrophages and neutrophils cooperate in immune responses to *Leishmania* infection. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 68, n. 11, p.1863-1870, 2011.

GILLESPIE, P. M. *et al.* Status of vaccine research and development of vaccines for

leishmaniasis. **Vaccine**, [s.l.], v. 34, n. 26, p.2992-2995, 2016.

GIUDICE, A. *et al.* Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**, [s.l.], v. 7, n. 7, p. 1 – 12, 2007.

GOMES-SILVA, A. *et al.* Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Parasitology**, Cambridge, v. 140, n. 6, p. 771 – 779, 2013.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. *et al.* *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 106, n. 16, p. 6748 – 6753, 2009.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, [s.l.], v. 18, n. 8, p. 332 – 334, 2002.

HARMS, G. *et al.* Cutaneous leishmaniasis associated with extensive lymphadenopathy during an epidemic in Ceará State, northeast Brazil. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 93, n. 3, p.303-310, 2005.

HOTEZ, P. J. *et al.* Combating Tropical Infectious Diseases: Report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 38, p. 871 – 878, 2004.

HOTEZ, P. J. *et al.* Incorporating a Rapid-Impact Package for Neglected Tropical Diseases with Programs for HIV/AIDS, Tuberculosis, and Malaria: A comprehensive pro-poor health policy and strategy for the developing world. **PLoS Medicine**, São Francisco, v. 3, n. 5, p. 576 – 584, 2006.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 9, n. 8, p.604-615, 2011.

LAINSON, R.; KILLICK-KENDRICK, R.; FLISSER, A.. Ecological Interactions in the Transmission of the Leishmaniasis [and Discussion]. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 321, n. 1207, p.389-404, 1988.

LASKAY, T. *et al.* Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. **European Journal of Immunology**, [s.l.], v. 25, p. 2220 – 2227, 1995.

LASKAY, T.; ZANDBERGEN, G. V.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for Intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, v. 213, p. 183 – 191, 2008.

LAUFS, H. *et al.* Intracellular Survival of *Leishmania major* in Neutrophils Granulocytes after Uptake in the Absence of Heat-Labile Serum Factors. **Infection and Immunity**, Washington DC, v. 70, n. 2, p. 826 – 835, 2002.

LE BON, A; TOUGH, D. F. Links between innate and adaptive immunity via type I Interferon. **Current Opinion in Immunology**, [s.l.], v. 14, p. 432 – 436, 2002.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [s.l.], v. 2, p.3-8, 2012.

LO, S. K. *et al.* *Leishmania* Lipophosphoglycan Reduces Monocyte Transendothelial Migration: Modulation of Cell Adhesion Molecules, Intracellular Junctional Proteins, and Chemoattractants. **The Journal of Immunology**, [s.l.], v. 160, n. 4, p. 1857 – 1865, 1998.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil – Emerging Anthroponosis and Possibilities for Their Control. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 359 – 275, 1994.

MATTE, C.; OLIVIER, M. *Leishmania*-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. **Journal of Infectious Diseases**

MEAGHER, L. C. *et al.* Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B₂. **Journal of Leukocyte Biology**, [s.l.], v. 52, n. 3, p. 269 – 273, 1992.

MEARS, E. R. *et al.* A Review: The Current In Vivo Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 9, n. 9, 2015.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Jr. Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. **Cell**, [s.l.], v. 91, p. 295 – 298, 1997.

MEIRELES, C. B. *et al.* Atypical presentations of cutaneous leishmaniasis: A systematic review. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 172, p. 240 – 254, 2017.

MOLLINEDO, F. *et al.* Selective Fusion of Azurophilic Granules with *Leishmania*-containing Phagosomes in Human Neutrophils. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 285, n. 45, p.34528-34536, 2010.

MOLYNEUX, D. H. Common themes in changing vector-borne disease scenarios. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s.l.], v. 97, p. 129 – 132, 2003.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 8, n. 12, p.958-969, 2008.

MÜLLER, K. *et al.* Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Medical Microbiology And Immunology**, [s.l.], v. 190, n. 1-2, p.73-76, 2001.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; PAULA-COELHO, V. N. de. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF- α production, but only via TNF- α it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. **International Immunopharmacology**, [s.l.], v. 8, n. 12, p.1633-1638, 2008.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 6, n. 3, p. 173 – 182, 2006.

NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia Humana**. Rio de Janeiro: Editora Atheneu Rio, 2016. 264 p.

NIÑO, A.; CAMACHO, M. *Leishmania (Viannia) braziliensis* growth in vitro culture relies more on folic acid availability than *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, [s.l.], v. 100, n. 3, p.309-310, 2005.

NOVAIS, F. O. et al. Neutrophils and Macrophages Cooperate in Host Resistance against *Leishmania braziliensis* Infection. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 183, n. 12, p.8088 – 8098, 2009.

OFEK, I. et al. NONOPSONIC PHAGOCYTOSIS OF MICROORGANISMS. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 239 – 276, 1995.

OLIVEIRA, C. I. de; BRODSKY, C. I.. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Frontiers In Immunology**, [s.l.], v. 3, p.1-9, 2012.

OSORIO, L. E.; CASTILLO, C. M.; OCHOA, M. T. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in Colombia: clinical characteristics. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s.l.], v. 59, n. 1, p. 49 – 52, 1998.

PEARSON, R. D.; SOUZA, A. Q. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 22, p. 1 – 13, 1996.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, [s.l.], v. 321, n. 5891, p. 970 – 974, 2008.

PRAJEETH, C. K. et al. *Leishmania*-Infected Macrophages Are Targets of NK Cell-Derived Cytokines but Not of NK Cell Cytotoxicity. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 79, n. 7, p.2699-2708, 2011.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 7, p. 581-596, 2007.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Macrophage Interactions with Neutrophils Regulate *Leishmania major* Infection. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 172, n. 7, p.4454-4462, 2004.

RINCÓN, M. Y. *et al.* Leishmaniasis Cutánea Diseminada: Reporte de Dos Casos en Santander, Colombia. **Revista de Salud Pública**, Bogotá D.C., v. 11, n. 1, p. 145 – 150, 2009.

RITTER, U.; FRISCHNECHT, F.; ZANDBERGEN, G. V. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? **Trends in Parasitology**, [s.l.], v. 25, n. 11, p. 505 – 510, 2009.

ROCHA, F. J. S. *et al.* Cytokines, Signaling Pathways, and Effector Molecules Required for the Control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Mice. **Infection and Immunity**, Washington DC, v. 75, n. 8, p. 3823 – 3832, 2007.

RODRIGUES, A. M. *et al.* Fatores associados ao insucesso do tratamento de leishmaniose cutânea com antimoniato de meglumina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 2, 139 – 145, 2006.

RODRÍGUEZ, N. E.; WILSON, M. E. Eosinophils and mast cells in leishmaniasis. **Immunologic Research**, [s.l.], v. 59, n. 1-3, p.129-141, 2014.

ROJAS, J. *et al.* Macrophage Heterogeneity and Plasticity: Impact of Macrophage Biomarkers on Atherosclerosis. **Scientifica**, [s.l.], v. 2015, p. 1 – 17, 2015.

ROTUREAU, B. Are New World leishmaniases becoming anthroponoses? **Medical Hypotheses**, [s.l.], v. 67, n. 5, p.1235-1241, 2006.

SALDANHA, R. R. de *et al.* Meglumine antimonate treatment enhances phagocytosis and TNF- α production by monocytes in human cutaneous leishmaniasis. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 106, n. 10, p.596-603, 2012.

SAMUELSON, J. *et al.* A Mouse Model of *Leishmania braziliensis braziliensis* Infection Produced by Coinjection with Sand Fly Saliva. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 173, p. 49 – 54, 1991.

SANTOS, P. I. *et al.* *Leishmania chagasi* naturally resistant to nitric oxide isolated from humans and dogs with visceral leishmaniasis in Brazil. **Nitric Oxide**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.67-71, 2012.

SANTRICH, C. *et al.* Mucosal Disease Caused by *Leishmania Braziliensis Guyanensis*. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 42, n. 1, p.51-55, 1990.

SEGAL, Anthony W. HOW NEUTROPHILS KILL MICROBES. **Annual Review Of Immunology**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.197 – 223, 2005.

SELYE, H. Induction of topical resistance to acute tissue injury: an experimental study with the granuloma pouch technique. **Surgical Clinics of North America**, [s.l.], v. 97, p. 1417 – 1446, 1953.

SOUSA, A. Q. *et al.* Bubonic Leishmaniasis: A Common Manifestation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection in Ceara, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s.l.], v. 53, n. 4, p. 380 – 385, 1995.

SOUZA, A. S. *et al.* Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF- α production. **BMC Infectious Diseases**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 1 – 11, 2010.

SPÄTH, G. F. *et al.* The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 100, n. 16, p. 9536 – 9541, 2003.

TEIXEIRA, C. R. *et al.* Saliva from *Lutzomyia longipalpis* Induces CC Chemokine Ligand 2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression and Macrophage Recruitment. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 175, n. 12, p.8346-8353, 2005a.

TEIXEIRA, M. J. *et al.* Distinct *Leishmania braziliensis* Isolates Induce Different Paces of Chemokine Expression Patterns. **Infection and Immunity**, [s.l.], v. 73, n. 2, p. 1191 – 1195, 2005b.

TEIXEIRA, M. J. *et al.* Chemokines in host–parasiteinteractions in leishmaniasis. **Trends In Parasitology**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.32-40, 2006.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.133 – 146, 2003.

TURETZ, M. L. *et al.* Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 186, p. 1829 – 1834, 2002.

UTHAISANGSOOK, S. *et al.* Innate immunity and its role against infections. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, [s.l.], v. 88, p. 253 – 265, 2002.

VASCONCELOS, C. O. *et al.* DISTINCT CELLULAR MIGRATION INDUCED BY *Leishmania infantum chagasi* AND SALIVA FROM *Lutzomyia longipalpis* IN A HEMORRHAGIC POOL MODEL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s.l.], v. 56, n. 1, p.21-27, 2014.

VESTER, B. *et al.* Early Gene Expression of NK Cell-Activating Chemokines in Mice Resistant to *Leishmania major*. **Infection and Immunity**, [s.l.], v. 67, n. 6, p. 3155 – 3159, 1999.

WADDELL, S. J. *et al.* Dissecting Interferon-Induced Transcriptional Programs in Human Peripheral Blood Cells. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 5, n. 3, p.1-13, 2010.

WALKER, J. A.; BARLOW, J. L.; MCKENZIE, A. N. J. Innate lymphoid cells — how did we miss them? **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 13, n. 2, p.75-87, 2013.

WANDERLEY, J. L. M. *et al.* Mimicry of Apoptotic Cells by Exposing Phosphatidylserine Participates in the Establishment of Amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in Mammalian Hosts. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 176, n. 3, p.1834-1839, 2006.

WANG, K. S.; FRANK, D. A.; RITZ, J. Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. **Blood**, [s.l.], v. 95, p. 3183 – 3190, 2000.

WILSON, M. E.; PEARSON, R. D. Roles of CR3 and Mannose Receptors in the Attachment and Ingestion of *Leishmania donovani* by Human Mononuclear Phagocytes. **Infection and Immunity**, [s.l.], v. 56, n. 2, p. 363 – 369, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The World Health report: 2004: changing history**. Geneva: World Health Organization, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of the leishmaniases.** Geneva: World Health Organization, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis in high burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Weekly Epidemiological Record**, n. 22, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Neglected tropical diseases.** Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 31 maio 2017.

ZANDBERGEN, G. V. *et al.* Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 173, n. 11, p.6521-6525, 2004.

ZANDBERGEN, G. V. *et al.* *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 103, n. 37, p.13837-13842, 2006.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (CEUA-UFC)



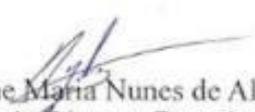
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 78/2013, sobre o projeto intitulado: **"EFEITO DE CXCL10 EM CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM CEPA DE LEISHMANIA BRAZILIENSISREFRATÁRIA AO ANTIMÔNIO"**, de responsabilidade da Profa. Dra. Maria Jania Teixeira e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 16 de maio de 2014.

Fortaleza, 16 de maio de 2014


Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Prof. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar
Coordenadora da CEPA/DIFFIFAMED/UFCE
MAT. SIAPE 2166369

Fonte: Universidade Federal do Ceará (2014).