



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA**

DOROTHEIA TEIXEIRA ALVES

**EFEITO DA QUIMIOTERAPIA CXCL10 NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR
Leishmania infantum IN VITRO**

**FORTALEZA
2016**

DOROTHEIA TEIXEIRA ALVES

**EFEITO DA QUIMIOCINA CXCL10 NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR
Leishmania infantum IN VITRO**

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico (a).

Orientadora: Profa. Dra. Maria Jania Teixeira

Co-orientadora: Naya Lúcia de Castro Rodrigues

**FORTALEZA
2016**

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)

- A478e Alves, Dorotheia Teixeira.
 Efeito da quimiocina CXCL10 na infecção de macrófagos por *Liehmania infnatum* in vitro / Dorotheia
 Teixeira Alves. – 2016.
 47 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia,
 Odontologia e Enfermagem, Curso de Enfermagem, Fortaleza, 2016.
 Orientação: Profa. Dra. Maria Jania Teixeira.
 Coorientação: Profa. Ma. Naya Lúcia de Castro Rodrigues.
1. *Leishmania infantum*. 2. CXCL10. 3. óxido nítrico. 4. citocinas. I. Título.

CDD 610.73

DOROTHEIA TEIXEIRA ALVES

**EFEITO DA QUIMIOCINA CXCL10 NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR
Leishmania infantum IN VITRO**

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico (a).

Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Erika Salles Brito
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

MSc. Webertty Mayk Eufrásio de Figueiredo
Universidade Federal do Ceará

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu incalculável amor, por me encher de vida e coragem, por todos os “dias seguintes”, pelas oportunidades de recomeço e por me manter de pé, colocando em minha vida pessoas que me amparam e me amam.

Aos meus amados pais e, em especial, a minha mãe, pelo apoio e incentivo constante, incansável e ilimitado aos meus estudos. Por acreditar em mim e lutar comigo para realizar mais um sonho. A ela, todo o meu esforço, gratidão, amor e conquista. Foi por ela o início, e a continuação é por nós.

À minha querida orientadora e tia, Maria Jania Teixeira, onde me faltam palavras para agradecer, não só pela orientação no desenvolvimento desse trabalho, mas por todas as oportunidades oferecidas a mim, mesmo quando não mereci; pela alegria contagiante, os ensinamentos únicos, o amor em suas palavras pacientes. A “estrada” do amadurecimento como pessoa e profissional foi maior por causa dela. Minha inspiração como ser humano e como farmacêutica.

À minha irmã, Ana Virgínia Alves Teixeira, pela cumplicidade e pelo papel de mãe desempenhado por ela, diversas vezes, em nossa casa em Fortaleza.

Ao meu “tripé” na faculdade, Juliana e Marília, por todas as madrugadas de estudos desesperados, ao longo desses cinco anos; pela amizade sincera, pelo carinho necessário para seguir em frente, as motivações diárias e confiança estabelecida entre nós. Gratidão.

Ao grupo formado durante a faculdade intitulado “farmacats”, sem esse grupo não teria chegado onde estou, pois houve companheirismo mútuo, ajuda e respeito em todos os dias. Foi uma benção de Deus ter a companhia dessas pessoas durante essa jornada.

À professora Erika Salles Brito por aceitar participar dessa banca e acrescentar seu conhecimento para somar nesse trabalho.

À querida MSc. Naya Lúcia de Castro Rodrigues, pela co-orientação, pelo acompanhamento em bancada, pelas explicações ímpares, os puxões de orelha quando necessário e por contribuir tanto para a realização dessa conquista.

Ao Msc. Weberty Mayk Figueiredo, pela colaboração nos estudos, a ajuda em esclarecer dúvidas e por aceitar participar dessa banca.

Aos amigos do Setor de Parasitologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC, que me acolheram tão bem nessa família de mestres e doutores. Cada um

ajudou em algum aspecto e a participação de todos foi necessária, seja em uma conversa de incentivo ou em contagens intermináveis em placas de culturas de *Leishmania*.

A todos os amigos que fiz no curso de Farmácia e que espero que fiquem para sempre, em especial Gabriela Freire e Letícia Braga, que fizeram esses meus anos muito mais leves. Aos queridos colegas da turma 2016.1 e a todos os professores que, por mim, passaram nesse período.

À minha amiga Karla Telles, por ter surgido na hora certa, por lembrar quem eu sou, quando esqueço; por, repetidamente, expor o quanto acredita no meu potencial e por se alegrar com a minha vitória. Meu sincero amor.

À instituição de apoio à pesquisa CNPq, pelo apoio financeiro a essa pesquisa, sob a forma de bolsa de iniciação científica.

“O coração está sempre pronto para assumir riscos, é um jogador. A cabeça é um homem de negócios, sempre calcula, é astuta. O coração nunca calcula nada.”
(Osho)

RESUMO

A leishmaniose visceral causada por *Leishmania infantum* é caracterizada pela perda da habilidade do hospedeiro em gerar uma resposta imunológica eficaz. A quimiocina CXCL10 já vem mostrando resultados promissores no tratamento contra o parasito. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito in vitro de CXCL10 e sua associação com Glucantime em macrófagos infectados por *L. infantum*. Para isso, macrófagos RAW 264 foram infectados por *L. infantum* e tratados ou não com CXCL10 (25, 50 e 100ng/mL), Glucantime (16mg/mL), LPS (20ng/mL) e CXCL10+Glucantime [(25, 50 e 100ng/mL) + (16mg/mL)]. Após 24 e 48h de infecção, avaliou-se: carga parasitária nos macrófagos, concentração de óxido nítrico (NO) e das citocinas IL-4 e IL-10 nos sobrenadantes das culturas. Os resultados mostraram que o tratamento com CXCL10 e a associação CXCL10+Glucantime resultaram em uma significativa redução da carga parasitária com 24h, variando entre 64% a 74% (CXCL10 de 25ng/mL e 100 ng/mL) e 68% a 75,0% (CXCL10+Glucantime de 25 ng/mL e 100 ng/mL), e com 48h, entre 67% a 73% (CXCL10 de 25ng/mL e 100 ng/mL) e 72% a 78% (CXCL10+Glucantime de 25ng/mL e 100 ng/mL), quando comparado com o controle não tratado, enquanto o tratamento com Glucantime sozinho apresentou redução de 50% da infecção. A redução da carga parasitária foi correlacionada com o aumento de NO nas concentrações 50 e 100ng/mL de CXCL10, com 24 e 48h. No entanto, não foi observada a mesma dinâmica quando utilizada a associação CXCL10+Glucantime. Os resultados em relação as citocinas mostraram que o tratamento com CXCL10 inibiu a secreção de IL-10 ($p<0,001$) com 24 e 48h, e inibiu também a produção de IL-4, sendo significativo com 24h pós-infecção ($p<0,01$). Os sobrenadantes obtidos com 48h após infecção apresentaram resultados similares em relação à redução, embora não tenha mostrado significância. Em conclusão, o tratamento in vitro com CXCL10 induziu diminuição significativa da carga parasitária, das citocinas IL-10 e IL-4, com aumento significativo de NO, em macrófagos RAW 264 infectados por *L. infantum*. A associação de CXCL10 com Glucantime, embora reduza a carga parasitária intracelular in vitro, induz inibição da produção de NO de forma dose-dependente, sugerindo que outros mediadores estão envolvidos no controle da infecção.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, CXCL10, citocinas, óxido nítrico.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is characterized by loss of the host's ability to generate an effective immune response. The chemokine CXCL10 is already showing promising results in the treatment against the parasite. This work aimed to evaluate the in vitro effect of CXCL10 and its association with Glucantime in macrophages infected by *L. infantum*. Macrophages RAW 264 were infected with *L. infantum*, and posteriorly were either treated or not with CXCL10 at the concentrations of 25, 50 and 100 ng/mL, Glucantime (16 mg/mL), LPS (20 ng/mL) and CXCL10+Glucantime [(25, 50 and 100 ng/mL) + (16 mg/mL)]. Parasite load in macrophages, nitric oxide concentrations and the cytokines IL-4 and IL-10 were assessed from the culture supernatants at both 24 and 48 hours after infection. The results showed that treatment with CXCL10 and CXCL10+Glucantime combined reduced significantly parasitic load, whereas the treatment with Glucantime alone presented reduction of only 50% of the infection when compared with control group. Twenty-four hours after infection, reduction of parasitic load varied between 64% and 74%, and 68% to 75% when treated with CXCL10 and CXCL10+Glucantime combined, respectively. Forty-eight hours after infection, reduction of parasitic load varied between 67% and 73%, and 72% to 78% when treated with CXCL10 and CXCL10+Glucantime combined, respectively. At the concentrations of 50 and 100 ng/mL of CXCL10, reduction of the parasitic load and increase of NO concentrations were simultaneously observed after 24 and 48 hours ($p < 0.001$). Similar results were not found when CXCL10+Glucantime combined were used. Regarding inflammatory cytokines' results, CXCL10 inhibited IL-10 secretion ($p < 0.001$) after 24 and 48 hours. CXCL10 also inhibited IL-4 production, showing significant inhibition 24 hours after infection ($p < 0.001$). Alike results were found in analysis of the supernatants obtained from 48 hours after infection regarding the reduction, although not significant. We conclude that in vitro treatment with CXCL10 induced increase in NO concentrations and reduced significantly parasitic load and induced low production of IL-10 e IL-4 on *L. infantum*-infected macrophages. CXCL10 association with Glucantime, although reduces intracellular parasite load in vitro, induces inhibition of NO production in a dose-dependent manner, suggesting that other mediators are involved in infection control.

Key words: *Leishmania infantum*, CXCL10, cytokines, nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

1.	Leishmaniose Visceral: Situação no mundo.....	15
2.	Leishmaniose Visceral nas Américas, 2001 a 2011.....	15
3.	Leishmaniose Visceral no Brasil, 2001 a 2011.....	16
4.	Ciclo de vida de <i>Leishmania infantum</i>	17
5.	Carga parasitária em macrófagos da linhagem RAW 264 infectados com <i>Leishmania infantum</i> e tratados com CXCL10.....	33
6.	Carga parasitária em macrófagos da linhagem RAW 264 infectados com <i>Leishmania infantum</i> e tratados com associação de CXCL10+Glucantime.....	34
7.	Concentração de óxido nítrico por macrófagos infectados com <i>Leishmania infantum</i> e tratados com CXCL10.....	35
8.	Concentração de óxido nítrico por macrófagos infectados com <i>Leishmania infantum</i> resistente ao antimônio e tratados com a associação de Glucantime+CXCL10.....	36
9.	Produção de IL-4 e IL-10 por macrófagos infectados com <i>Leishmania infantum</i> e tratados com CXCL10.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CXCL10	Interferon gama induzido por proteína 10
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
IFN- γ	Interferon gama
IL-	Interleucina
L	Leishmania
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
LV	Leishmaniose visceral
MCP	Proteína quimioatrante monocítica
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
MS	Ministério da Saúde
NK	“Natural Killer”
NO	Óxido nítrico
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução-tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMN	Polimorfonucleares
SBF	Soro bovino fetal
STAT	Transdutores do sinal e ativador da proteína da transcrição
TGF- β	Fator transformador de crescimento β
Th 1/2	T “helper” 1/2
TNF	Fator de necrose tumoral
TRL	Receptores “toll-like”

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Leishmaniose visceral: aspectos patológicos e clínicos	13
1.2	Epidemiologia	14
1.3	Ciclo de <i>Leishmania infantum</i>	16
1.4	A imunopatogênese de <i>Leishmania infantum</i>	18
1.5	Quimiocinas e seus receptores	21
1.6	Quimiocinas e o papel de CXCL10 na Leishmaniose.....	23
1.7	Tratamento e resistência aos Antimoniais Pentavalentes.....	24
2	JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo Geral	28
3.2	Objetivos Específicos	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	Desenho experimental	29
4.2	Reagentes e Meios de cultura	29
4.3	Parasitas	29
4.4	Isolamento, cultura, infecção e tratamento de macrófagos	30
4.5	Determinação da taxa de infecção de macrófagos	30
4.6	Dosagem de citocinas	31
4.7	Dosagem de óxido nítrico (NO)	31
4.8	Análise estatística	32
5	RESULTADOS	33
5.1	Avaliação da infecção de macrófagos por <i>Leishmania infantum</i> in vitro	33
5.2	Produção de Óxido Nítrico por macrófagos infectados por <i>Leishmania infantum</i> in vitro e tratados com CXCL10.....	35
5.3	Produção de citocinas anti-inflamatórias.....	37
6	DISCUSSÃO	38
7	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose Visceral: Aspectos patológicos e clínicos

A leishmaniose visceral (LV) é considerada primariamente como uma zoonose, podendo acometer o homem, quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, transformando-se em uma antroponose. Atualmente, encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (TDR/WHO, 2014).

Trata-se de uma enfermidade causada por um protozoário intracelular heteroxênico (digenético) do gênero *Leishmania* e transmitido pela picada de insetos dípteros, os flebotomíneos, do gênero *Lutzomyia* nas Américas, pertencentes à família *Psychodidae* (NEVES, 2005)

O complexo *Leishmania donovani* inclui as três espécies responsáveis pela leishmaniose visceral no mundo: *Leishmania (Leishmania) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* (NEVES, 2005). *L. donovani* e *L. infantum* são as espécies causadoras de LV no Velho Mundo, e *L. chagasi* nas Américas (PISCOPO; MALLIA, 2006). Apesar das diferenças no nome e na origem geográfica de *L. infantum* e *L. chagasi*, estudos envolvendo diferentes marcadores moleculares, sugerem que a diversidade entre as espécies é restrita, o que impede sua distinção (MAURÍCIO et al., 2000), questionando sua classificação separadamente. Entretanto, diferenças entre estas espécies quanto a estrutura molecular e sua antigenicidade foram evidenciadas, o que reforça a discriminação entre as espécies (SOUSA et al., 2015). Finalmente, pela lei de prioridade (o nome anterior prevalece) o nome *L. infantum* é o nome válido, mesmo para agente causal da LV nas Américas, pois esse nome foi descrito primeiro. É a lei da prioridade de um princípio básico da nomenclatura zoológica (DANTAS-TORRES, 2006).

A principal via de transmissão, nas condições naturais, é através da picada da fêmea de *Lu. longipalpis*, durante o repasto sanguíneo em vertebrados. A fêmea inocula as formas promastigotas metacíclicas juntamente com sua saliva, rica em substâncias com grande potencial inflamatório e vasodilatador, o que contribui para o aumento de células fagocitárias neste local. Esse fator é crucial, visto que no hospedeiro vertebrado, as formas amastigotas de *L. infantum* são encontradas parasitando células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), principalmente macrófagos (NEVES, 2005). A pele é a porta de entrada para a infecção, contudo, ocorre a migração dos parasitos para os linfonodos, seguida da migração para as vísceras, as quais o parasito tem tropismo, especialmente baço, fígado e medula óssea.

As manifestações clínicas da doença podem variar de uma infecção assintomática a uma doença visceral progressiva, que se não for tratada pode levar ao óbito em 90% dos casos. A leishmaniose visceral ativa é caracterizada por febre, perda de peso, hipergamaglobulinemia, hepatoesplenomegalia, anemia, trombocitopenia, leucopenia e imunossupressão (WILSON et al., 2005).

A suspeita diagnóstica da LV deve ser baseada em dados epidemiológicos e nos achados clínicos e laboratoriais, mas o diagnóstico de certeza só pode ser firmado através do encontro do parasito em tecido infectado (PASTORINO et al., 2002). Os exames sorológicos, como a Imunofluorescência Indireta (IFI) e ELISA, possuem boa sensibilidade, mas podem apresentar reações cruzadas com antígenos de outros organismos, como *Trypanosoma*, *Mycobacterium*, *Plasmodium* e *Schistosoma* (KAR, 1995). A pesquisa de antígenos de *Leishmania* pela técnica de PCR (reação em cadeia polimerase) apresenta alta sensibilidade e especificidade, mas deve ser considerada com cuidado, principalmente nos pacientes provenientes de áreas endêmicas, com alta exposição antigênica (RAVEL et al., 1995).

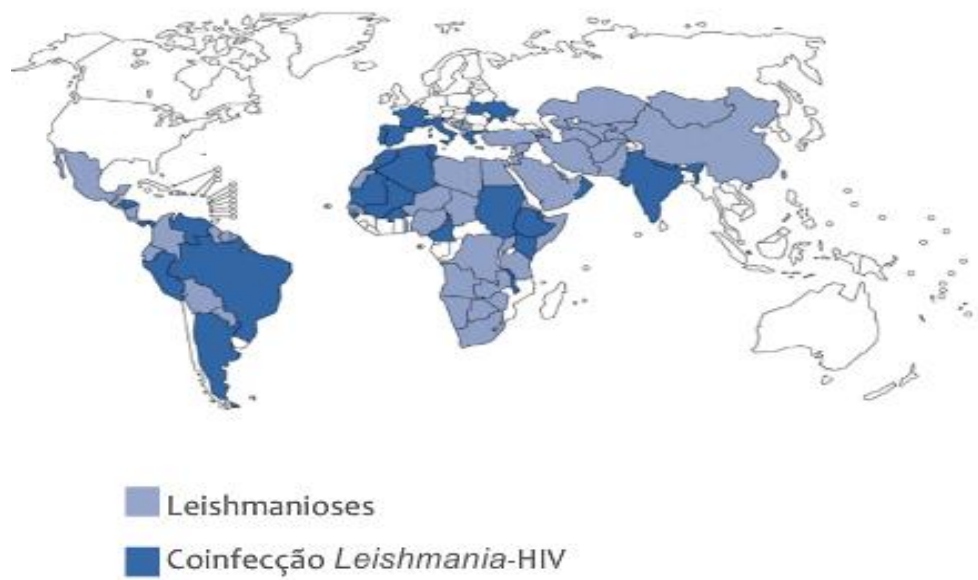
1.2 Epidemiologia

A LV, dada a sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, é também considerada oportunista em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade (BRASIL. Ministério da Saúde, 2014).

A OMS estima que ocorram 500.000 novos casos por ano em todo o mundo. No Brasil, dados do MS relatam a ocorrência média de 3.100 casos novos por ano, 54% deles em crianças menores de 10 anos (NEVES, 2005). A LV tem ampla distribuição, ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas, onde também é denominada leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar neo-tropical (Fig. 1). Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste (BRASIL. Ministério da Saúde, 2014) (Fig. 2).

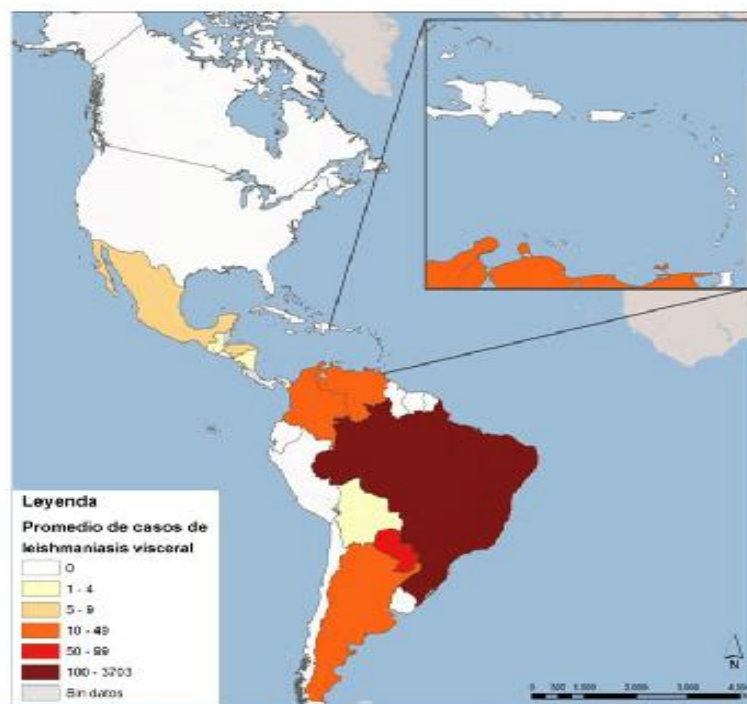
Um estudo realizado sobre LV nas Américas, de 2001 a 2011, mostrou que houve uma média de 3.500 casos/ano, onde 96,6% destes casos foram no Brasil (BRASIL. Fiocruz, 2012). Contudo, levando-se em conta as subnotificações, há uma estimativa que a média de casos nas Américas seja de 4.500 a 6.800 casos/ano (Fig. 3) (ALVAR, 2012).

Figura 1. Leishmaniose Visceral: Situação no mundo.



Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2010

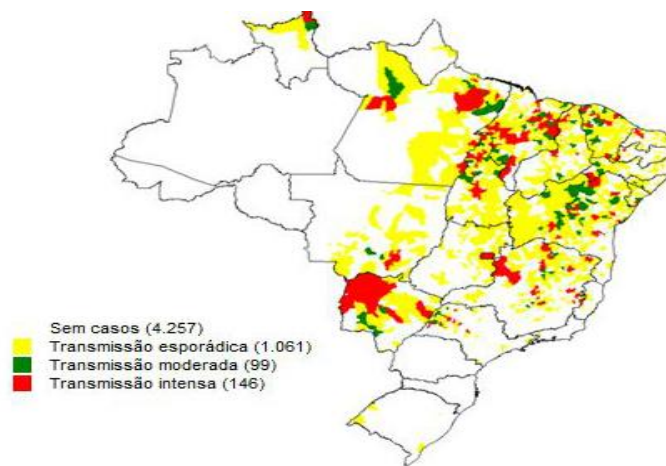
Figura 2. Leishmaniose Visceral nas Américas, de 2001 a 2011



Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2012.

Segundo dados levantados, em 2012 foram registrados no Brasil 3.038 casos de LV, com incidência de 1,57 casos/100.000 habitantes, onde 62,8% eram do sexo masculino, e o maior índice de incidência ocorreu no Nordeste com 43,1% dos casos. A coinfeção com HIV foi estimada em 8,5% (BRASIL. Fiocruz, 2012). O estado do Ceará, historicamente, ocupa o **primeiro** ou segundo lugar em número de casos, com uma média anual de **467 casos** relatados durante a última década, onde **38%** dos casos ocorreram em Fortaleza. Houveram 279 óbitos, onde **109** foram em Fortaleza. (MONTEIRO, 2016)

Figura 3. Leishmaniose Visceral no Brasil, 2001 a 2011.

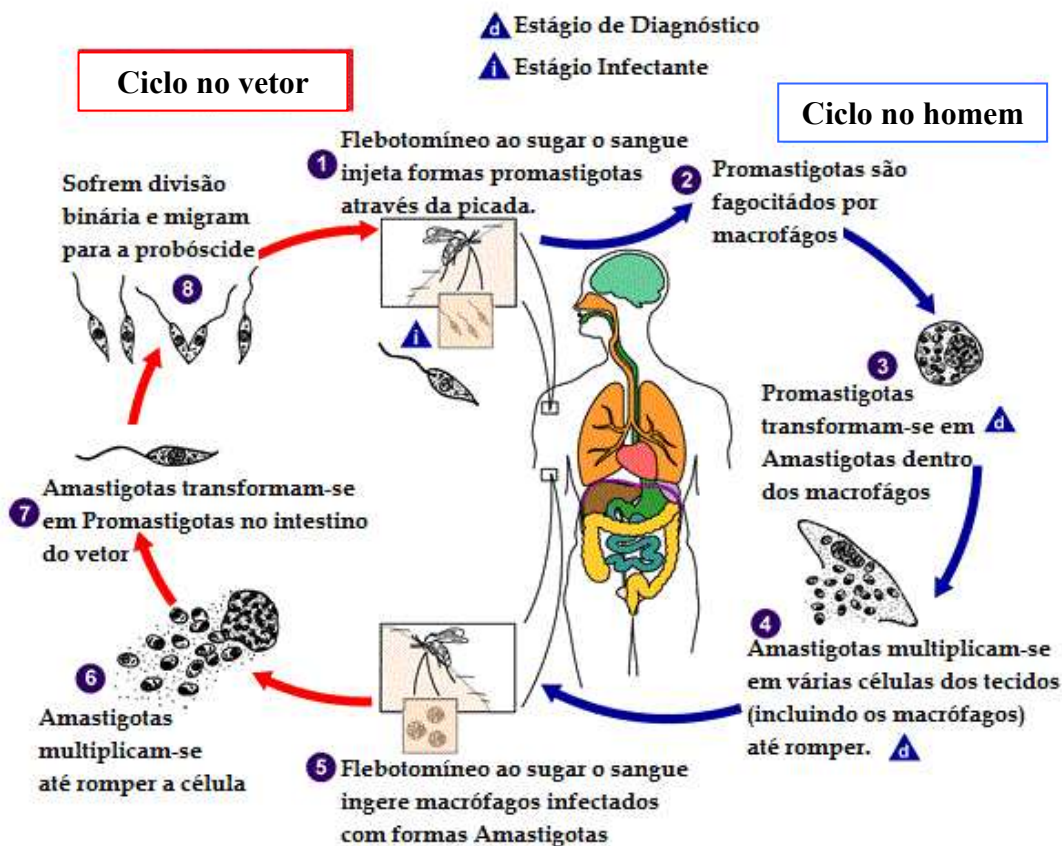


Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2012.

1.3 Ciclo de *Leishmania infantum*

O flebotomíneo infectado inocula as formas promastigotas metacíclicas do parasito na derme do hospedeiro, homem ou animal, no momento do seu repasto sanguíneo. No organismo do hospedeiro vertebrado, essas formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos e outras células fagocitárias. Os parasitos fagocitados permanecem dentro do fagolisossomo, onde se transformam em amastigotas e se multiplicam por divisão binária. Essa divisão parasitária acarreta o rompimento da membrana celular dos macrófagos e a liberação das amastigotas que infectam novas células. Assim, os parasitos com tropismo preferencialmente viscerotrópico disseminam-se para os órgãos alvo, medula óssea, fígado e baço. Essas formas amastigotas, livres ou no interior de células fagocíticas infectadas no hospedeiro vertebrado, são as responsáveis pela infecção do flebotomíneo, no seu próximo repasto sanguíneo (Fig. 4) (BRASIL. Fiocruz, 2015; NEVES, 2005).

Figura 4. Ciclo de vida de *Leishmania infantum*



Fonte: Adaptado do Center for Disease Control and Prevention (CDC), 2010.

O ciclo parasitário no flebotomíneo se inicia após a ingestão das amastigotas no momento do repasto sanguíneo. Na porção média do tubo digestivo, as células fagocíticas se rompem, liberando as amastigotas que irão se transformar em promastigotas procíclicas. Essas formas promastigotas sofrem maturação, se transformando em promastigotas metacíclicas e na porção anterior do tubo digestivo do vetor, se multiplicam por divisão binária, e ali permanecem até que sejam inoculadas no hospedeiro vertebrado, no momento em que a fêmea do flebotomíneo realiza um novo repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo no hospedeiro vertebrado (BRASIL. Fiocruz, 2015; NEVES, 2005).

As leishmânias são organismos pleomórficos, isto é, nos invertebrados encontram-se as formas paramastigotas e promastigotas, e nos vertebrados a forma denominada amastigota (Michalick & Genaro, 2005). São parasitos intracelulares obrigatórios, multiplicando-se nos fagócitos mononucleares do sistema mononuclear fagocítico (Santos Gomes et al., 2000)

1.4 A imunopatogênese de *Leishmania infantum*

A LV humana é caracterizada por uma diminuição da resposta imunológica celular ao antígeno de *Leishmania* (BACELLAR, 2005). A principal defesa do hospedeiro vertebrado contra as leishmanioses é a sua capacidade de ajustar a resposta imunológica, mediada por célula, demonstrada pela proliferação de linfócitos e produção de altos níveis de IFN- γ e TNF- α , tornando-a capaz de controlar ou até mesmo eliminar o parasito (BACELLAR et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2006; SILVA et al., 2007; SCHNORR et al., 2012). A infecção por *Leishmania* induz também forte resposta humoral, mas os anticorpos aparentemente não desempenham nenhuma função protetora in vivo (TRIPATHI et al., 2007).

Após a inoculação do parasito pelo flebotomíneo, as formas promastigotas são fagocitadas pelos neutrófilos, que são as primeiras células a migrarem para o local da infecção e podem ser destruídas através da ação de produtos do metabolismo oxidativo, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e óxido nítrico (NO). Os neutrófilos infectados começam a secretar quimiocinas como IL-8 (CXCL-8) e CCL3 (MIP-1 β), moléculas importantes para atrair mais neutrófilos e macrófagos para o sítio da infecção (BACELLAR, 2005).

A produção de NO como uma via efetora comum de defesa do macrófago contra a *Leishmania* tem sido bem documentada. Níveis de NO produzidos por macrófagos ativados por IFN- γ ou por TNF- α estão relacionados com resistência à infecção. Em estudos realizados com *L. donovani*, observou-se que na ausência do gene de nitrato sintetase (enzima que catalisa a síntese de NO) camundongos não têm capacidade de controlar a infecção (BARRAL-NETO, 1991).

As células T “helper” tipo 1 (Th1) produzem IFN- γ e interleucina-2 (IL-2), fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), interleucina-3 (IL-3) e linfotóxina (TNF- β), e são responsáveis pela imunidade mediada por células, pelas reações inflamatórias, além de estimular, também, a produção de anticorpos da classe IgG2a. Células T “helper” tipo 2 (Th2) produzem interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13), e mediam a imunidade humoral e as reações alérgicas. A IL-4 está relacionada com a produção de anticorpos da classe IgE, IgG1 e IgG4; e a IL-5 é importante para a diferenciação, multiplicação e ativação de eosinófilos (MOSMANN, 1986).

O controle da infecção por *Leishmania* é dependente da resposta imunológica mediada por células. Uma citocina importante na resposta imunológica à *Leishmania* é IFN- γ , produzida principalmente por células T CD4⁺ do tipo Th1, e por células NK, estimuladas por

IL-12. Células Th1 produzem IFN- γ , o que ativa a enzima óxido nítrico sintetase (iNOS ou NOS2), levando ao estímulo da ação microbicida mediada por NO. A liberação de NO leva à morte do parasito em macrófagos humanos, que podem também ser estimulados pela ação de quimiocinas como MCP-1 (CCL2) (BRANDONISIO et al., 2002).

A atividade leishmanicida do macrófago está também na dependência da produção do fator de crescimento e transformação β (TGF- β). Essa citocina está relacionada com desativação de macrófago, inibição da ação de IFN- γ e redução da expressão de moléculas MHC classe II (DING, 1990).

A interleucina-10 (IL-10) é outra citocina produzida por macrófagos que contribui para a sobrevivência de *Leishmania* nessas células. IL-10 inibe a síntese de citocinas produzidas pelos macrófagos como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α (ABRAMS et al., 1991) e inibe a função dessas células como apresentadoras de antígeno através da diminuição da expressão de moléculas de MHC classe II (DE WALL MALEFYTY et al., 1991). Outro efeito importante de IL-10 nos macrófagos é a inibição dos eventos metabólicos associados com sua ativação (BODGAN et al., 2000). Esses efeitos, associados à capacidade desta citocina de suprimir a produção de IFN- γ por células Th1, fazem com que IL-10 interfira na atividade leishmanicida do macrófago.

A interleucina-12 (IL-12) tem sido apontada como um dos mais importantes componentes da fase inicial da infecção por *Leishmania*. IL-12 é produzida primariamente por células apresentadoras de antígeno (monócitos, macrófagos, células dendríticas e células B) e sua principal atividade biológica é sobre células T e células “natural killer” (NK), nas quais esta citocina estimula principalmente a produção de IFN- γ , além de proliferação celular e citotoxicidade (TRINCHIERI, 1996).

A principal alteração imunológica na LV é a incapacidade de linfócitos ativar macrófagos para destruir a *Leishmania*, em virtude da ausência da produção de IFN- γ após estímulo dos linfócitos com antígeno de *Leishmania* (CARVALHO et al., 1988). Esta incapacidade de produzir IFN- γ é antígeno-específica (CARVALHO et al., 1989).

Embora os pacientes com LV mostrem uma ativação policlonal de células B com grande produção de anticorpos, esses anticorpos não participam da resistência à leishmaniose (CARVALHO et al., 1983). Níveis elevados de complexos imunes circulantes e autoanticorpos são também observados na LV. As principais disfunções imunológicas na doença estão relacionadas à imunidade mediada por células. O sobrenadante de células

mononucleares, cultivadas com antígeno de *Leishmania*, também não é capaz de ativar macrófagos para destruir *Leishmania* in vitro, indicando que linfócitos desses pacientes não produzem citocinas capazes de ativar essas células (DUTRA et al., 1985).

Adicionalmente, tem-se observado alterações na função macrofágica, uma vez que células mononucleares do sangue periférico (PBMC) desses pacientes, quando estimulados in vitro com antígeno de *Leishmania*, não produzem IL-1 (HO et al., 1992) e a infecção de macrófagos com esse parasito diminui a expressão de MHC classe II (KEMP et al., 1993).

Embora o mecanismo das disfunções imunológicas na leishmaniose visceral não seja completamente esclarecido, admite-se que uma produção exacerbada de citocinas que tenham capacidade de suprimir a resposta imunológica celular desempenhe um papel importante na ausência da produção de IFN- γ e na sobrevivência de *Leishmania* nos macrófagos. Existem evidências de que, na LV humana, a ativação de células Th2 pode estar envolvida na progressão da doença. Foram demonstrados níveis altos de IL-4 no soro desses pacientes assim como também de IgE e IgG1 (ATTA et al., 1998) (PEDROSA et al., 1990). Em clones de células específicas para o antígeno de *Leishmania*, isolados de pacientes curados de LV, observou-se, além da produção de IFN- γ , produção de IL-4 e de IL-10 (KEMP et al., 1990). IL-10, por ser uma citocina inibidora da resposta imunológica, principalmente por antagonizar a ação de IFN- γ , um ativador potente dos macrófagos para matar *Leishmania* (MURRAY et al., 1983), é de grande importância no desenvolvimento de LV (KARP et al., 1993).

Em um estudo realizado com pacientes do Ceará infectados com *L. chagasi*, foi demonstrado que linhagens de células T CD8⁺ isoladas desses pacientes inibiram a resposta proliferativa e a produção de IFN- γ por células desses mesmos pacientes após a terapêutica. Essas alterações foram associadas a um aumento de IL-6 e de IL-10. Todos esses dados indicam que essa citocina tem um papel importante na patogênese da LV (HOLADAY et al., 1993).

Considerando que o principal achado imunológico na LV é uma diminuição da produção de IFN- γ por células mononucleares do sangue periférico, a ausência desta citocina impede a ativação de macrófagos e a destruição de *Leishmania* (BACELLAR, 2005).

A incapacidade de ativar macrófagos para destruir *Leishmania* é o principal defeito na LV, como já descrito acima, e essa anormalidade se associa com a multiplicação e disseminação do parasito e o envolvimento de múltiplos órgãos, como medula óssea, linfonodos, baço e fígado (BACELLAR, 2005). Pacientes com LV apresentam níveis séricos

altos de TNF- α e de IL-6 (CENINI et al., 1993), que diminuem após a terapêutica com antimonial. Essas citocinas estão relacionadas com febre e astenia e TNF- α , também conhecido como caquexina, pode contribuir para a perda de peso e acentuar a desnutrição nesses pacientes. Febre e perda de peso são características marcantes da LV. Emagrecimento, aumento de cílios e edema secundário à hipoalbuminemia são observados principalmente em crianças (GHALIB et al., 1993).

1.5 Quimiocinas e seus receptores

As quimiocinas são uma grande família de pequenas citocinas e têm geralmente baixo peso molecular, que varia entre 7 e 15 kDa. As quimiocinas e seus receptores são capazes de controlar a migração e a residência de todas as células do sistema imunológico. Algumas quimiocinas são consideradas pró-inflamatórias, e a sua liberação pode ser induzida durante uma resposta imunológica a um local de infecção; enquanto outras são consideradas homeostáticas e estão envolvidas no controle da migração de células durante o desenvolvimento do tecido ou manutenção (PALOMINO et al., 2015).

As citocinas estão diretamente envolvidas com a produção de quimiocinas e também podem preceder a expressão de algumas quimiocinas que, por sua vez, induzem a produção de mediadores inflamatórios adicionais. As citocinas exercem efeito secundário sobre a quimiotaxia de leucócitos, induzindo a expressão de vários genes de quimiocina (OHMORI et al., 1993; TEIXEIRA et al., 2006).

A importância fisiológica desta família de mediadores é resultante da sua especificidade, pois membros da família de quimiocinas induzem recrutamento de subconjuntos de leucócitos bem definidos (PALOMINO et al., 2015). Além do recrutamento de leucócitos, a atividade das quimiocinas leva à ativação de mecanismos de defesa do hospedeiro e estimula os eventos iniciais da cicatrização de feridas (GRAVES et al., 1995). Atuam, ainda, como mediadores cruciais na polarização de células Th1 e a ativação e tráfico de células envolvidas nas respostas inflamatórias (CHARO *et al.*, 2006). Durante a resposta inflamatória, são moléculas de suma importância por sua capacidade de desencadear a ativação de integrinas durante a adesão das células ao endotélio, induzir o recrutamento de linfócitos antígeno-específicos para os tecidos periféricos em resposta a uma inflamação, e liberar enzimas de estoques celulares (SPRINGER, 1994).

Devido a seu importante papel quimiotático e na mediação de processos inflamatórios, várias quimiocinas vêm sendo empregadas como agentes terapêuticos em infecções ou doenças em que o sistema imunológico necessita de estímulo. Além da atividade quimiotática, há crescente valorização da capacidade dessas moléculas de mediar a modulação de respostas de citocinas (GANGUR; SIMONS; HAYGLASS, 1998).

Existem duas principais subfamílias de quimiocinas baseadas na posição do primeiro resíduo de cisteína: CXC e CC. A subfamília das quimiocinas CC, também são conhecidas como beta-quimiocinas. Os genes que codificam para as quimiocinas CC estão localizados no cromossomo 17. Quimiocinas CC estimulam principalmente monócitos, mas também eosinófilos, basófilos, linfócitos T e células “natural killer” (NK). A outra subfamília, CXC, conhecidas como alfa-quimiocinas, têm um aminoácido alternando entre as primeiras duas cisteínas e estão localizados no cromossomo 4 (MURPHY et al., 2000). Estas quimiocinas, que estimulam a quimiotaxia, principalmente, de neutrófilos contém um Ácido glutâmico-Leucina-Arginina (ELR) na sequência da extremidade N-terminal que é essencial para a ligação ao receptor (CLARK-LEWIS et al, 1991; GRIFFITH et al., 2014).

Todas as quimiocinas exercem seus efeitos através de receptores compostos por um curto domínio amino- (NH₂) terminal, sete domínios transmembranares ligados por três alças na porção intracelular e mais três na porção extracelular, mais um domínio carboxi- (COOH) terminal intracelular. Os receptores de quimiocinas pertencem à superfamília dos receptores de sinalização intracelular acoplados a proteínas G e exercem suas funções através da sua ligação a receptores encontrados na superfície das células. Em geral os receptores podem se ligar a várias quimiocinas diferentes, e as quimiocinas se ligam a uma variedade de diferentes receptores, ou seja, existe pouca especificidade para os ligantes. Os leucócitos geralmente expressam mais de um tipo de receptor, com expressão diferencial em linfócitos, monócitos, granulócitos e outros tipos celulares (MURDOCH; FINN, 2000).

CXCL10 é segregada por vários tipos de células em resposta a IFN- γ . Estes tipos de células incluem monócitos, linfócitos T, células endoteliais, neutrófilos, esplenócitos, osteoblastos, queratinócitos, células do músculo liso e fibroblastos (LUSTER et al., 1985; ANTONICELLI et al., 2012). Várias funções têm sido atribuídas a CXCL10, tais como quimiotaxia de monócitos/macrófagos, células T, células NK e células dendríticas, promoção da adesão de células T às células endoteliais, atividade antitumoral, e a inibição da formação de colônias na medula óssea e angiogênese (DUFOUR et al., 2002). Esta

quimiocina induz os seus efeitos através da ligação à superfície celular do receptor de quimiocina CXCR3 (BOOTH et al., 2002).

CXCL10 é uma molécula pleiotrópica que exerce várias funções de acordo com o tipo de célula e a isoforma do receptor de CXCL10 que expressa. A forma madura da CXCL10 e dois outros membros da família de quimiocinas CXC, CXCL9 (MIG) e CXCL11 (I-TAC), se ligam ao receptor CXCR3, com uma maior afinidade para o CXCR3A do que com a isoforma CXCR3B. Uma terceira isoforma de CXCR3 (CXCR3-alt) é sempre co-expressa em um nível muito baixo com CXCR3A, mas sua função ainda não foi determinada (AKSOY et al., 2006; LO et al., 2010). De acordo com os tipos de células e receptores de CXCL10, várias vias de sinalizações podem ser ativadas (LOETSCHER et al., 1998; AKSOY et al., 2006; JI et al., 2008; MARU et al., 2008; LIU et al., 2011).

1.6 Quimiocinas e o papel de CXCL10 na Leishmaniose

Na leishmaniose, as citocinas parecem ter sinergia com elementos de *Leishmania* para regular a produção de quimiocinas. TNF- α e IL-1 β , juntamente com CCL3, foram relatadas como reguladores de células de Langerhans, mediadoras do transporte de *Leishmania* a partir da pele infectada para os linfonodos regionais (ARNOLDI et al., 1998; TEIXEIRA, et al. 2006). IL-12 é necessária para a indução de Th1 relacionada à quimiocinas, tais como XCL1, IFN- γ induzido por proteína 10 (também conhecida como CXCL10 ou IP-10; a seguir designado CXCL10) e CCL2 (ZAPH et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2006).

Curiosamente, Th1 e Th2 derivadas de citocinas podem ter efeitos antagonistas sobre quimiocinas. Por exemplo, algumas quimiocinas, tais como CXCL9 e CXCL10 são mais seletivamente induzidas por IFN- γ (FARBER, 1997; TEIXEIRA et al., 2006). As citocinas relacionadas com Th2, IL-4 e IL-13, induzem CCL22 e CCL6, produzidas por macrófagos, e essa produção é inibida por IFN- γ (BONECCI et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2006).

Durante a infecção, as citocinas podem também atuar sinergicamente com quimiocinas. IL-4 antagoniza a produção de CCL4 em macrófagos infectados por *Leishmania* (RITTER, 2000; TEIXEIRA et al., 2006). As quimiocinas estão implicadas na migração de células e/ou ativação de células residentes e migratórias, e tais células, por sua vez, produzem citocinas que influenciam a expressão de quimiocina (SACKS et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2006).

Na LV, algumas quimiocinas e receptores de quimiocinas têm um papel no desenvolvimento da resposta Th1, porque a sua supressão influencia IFN- γ produzidas por células T. Seguindo a ligação de receptores de células T na infecção por *L. donovani*, IFN- γ é produzido, induzindo a ativação de macrófagos e a morte dos parasitos. As quimiocinas também parecem estar implicadas na amplificação da resposta inflamatória por célula T, um importante passo para a defesa protetora do hospedeiro em leishmaniose visceral (COTERELL et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2006).

Camundongos submetidos à infecção por *L. donovani* sofrem uma acumulação hepática rápida de MIP-1 α , CCL2 e CXCL10 após a infecção (COTTERELL et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2005). No entanto, somente a expressão de CXCL10, amplificada por células T, permanece alta durante a fase final, e isso é essencial para permitir formação de granulomas no fígado. Células monocíticas atraídos por MIP-1 α e CCL2, e seguindo estimulação de IFN- γ , poderiam ser a fonte de quimiocinas mobilizadas por Th1, tais como CXCL10 (FARBER, 1997; TEIXEIRA et al., 2006).

Ao contrário das células do fígado, células do baço de camundongos infectados por *L. infantum* produzem citocinas tanto do tipo Th2 como Th1, com a resposta do tipo Th2 sendo dominante. Isto é compatível com a expressão sustentada de CCL2 em vez de CXCL10, mostrando deste modo que existe um influxo de macrófagos em vez de células T no baço (ROUSSEAU et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2006). Isso explica, em parte, porque o fígado normalmente controla a infecção, enquanto que os parasitos persistem no baço (KAYE et al., 1994; TEIXEIRA et al., 2006).

1.7 Tratamento e resistência aos Antimoniais Pentavalentes

Os medicamentos existentes disponíveis para o tratamento das leishmanioses (visceral e tegumentares) são os antimônias pentavalente - estibogluconato de sódio (Pentostam®) comercializado nos Estados Unidos e Europa e antimoniato de meglumina (Glucantime®) utilizado na América Latina e África, e vêm sendo utilizados como fármacos de primeira escolha no tratamento contra as leishmanioses desde a década de 1940 (KALANTARI, et al., 2014), com eficácia em torno de 85% (AREVALO et al., 2007) e algumas vantagens, como a rápida eliminação renal e a limitada acumulação nos tecidos (BERMAN, 1997; BLUM et al., 2004). Estes medicamentos provocam regressão rápida das manifestações clínicas e

hematológicas da doença, mas não provocam a esterilização do parasito (BERMAN et al., 1980).

Contudo, os antimoniais apresentam várias inconveniências que incluem dor no local da injeção, artralgia e mialgias, toxicidade cardíaca, e em alguns casos, insuficiência hepática e renal. Estas drogas também requerem tratamento prolongado e custo elevado (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRIGUEZ, 2001). Verifica-se, com frequência, o abandono do tratamento, ou uso de subdosagem, o que tem acarretado resistência ao tratamento com antimoniais de alguns pacientes, o que é, de longe, o maior problema que delinea o tratamento com os antimoniais (BERMAN, 1988; BLUM et al., 2004; CROFT et al., 2006).

Glucantime é especialmente eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. Devido às baixas dosagens e tratamentos descontínuos, começaram a ocorrer falhas na terapia e consequente aumento das formas resistentes de parasitos (BALANA-FOUCE et al., 1998). A OMS preconiza que as doses de antimoniais não devem ultrapassar 20 mg/kg/dia, não se ultrapassando o limite de 850 mg de antimônio, devido à sua elevada toxicidade. Mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos são efeitos colaterais frequentemente associados ao uso destes fármacos (RATH, 2003).

Após administração endovenosa ou intramuscular, Glucantime é rapidamente absorvido e, praticamente, 90% do antimônio é excretado nas primeiras 48 h pelos rins. Em consequência, faz-se necessária a administração de doses elevadas do fármaco, em regime contínuo, para garantir um elevado teor de antimônio nos tecidos e, assim, obter a eficácia do tratamento. Efeitos colaterais como nefrites, distúrbios gastrintestinais, cardiovasculares e respiratórios têm sido observados (ROBERTS et al., 1998).

As referências científicas citadas no Manual de Normas e Condutas do Ministério da Saúde (BRASIL. Ministério da Saúde, 2004) mostram que existem comorbidades que contraindicam o uso de Glucantime, cardiopatas, doença renal ou hepática. Nesses casos, a droga de 1ª escolha deverá ser outra. Deve-se lembrar que desvantagens ao uso do Glucantime como a resistência ao medicamento, administração intramuscular, e efeitos colaterais transitórios e algumas vezes letais em pacientes portadores de doenças renais, hepáticas, cardíacas, pancreatite e pneumonia, são relatados há décadas na literatura. Entretanto, o baixo custo é um fator importante para que este fármaco seja a primeira escolha em regiões endêmicas mundiais, inclusive no Brasil (MALTEZOU, 2010).

Antimoniais pentavalentes são geralmente 10 vezes menos tóxicos em células de mamíferos, quando comparados aos antimoniais trivalentes (tártaro emético), utilizados primeiramente por Gaspar Vianna em 1912. Em determinados casos, além de destruir o parasito, o medicamento acaba por levar o paciente ao óbito. O antimônio ainda pode ser detectado no cabelo do paciente tratado com antimoniais pentavalentes após um ano do término do tratamento (DOREA et al, 1999).

Os emergentes relatos da resistência ao antimônio em pacientes com leishmaniose em várias partes do mundo têm comprometido severamente a habilidade de controlar a doença (CROFT et al., 2006). Além disso, a resistência aos antimoniais pode significar uma situação alarmante frente ao aumento dos casos de co-infecção com HIV (OUELLETTE et al., 2004). Portanto, novos tratamentos contra as leishmanioses ou estratégias para melhorar a segurança e eficácia dos fármacos correntes continuam extremamente necessários.

Não há ainda vacina eficaz contra as leishmanioses, e historicamente, a quimioterapia dessas doenças tem sido baseada no uso de metais pesados tóxicos, particularmente componentes de antimônio, como descrito acima. Quando este tipo de tratamento não é efetivo, outras medicações usadas incluem Pentamidina e Anfotericina B. Todas essas medicações contra leishmaniose requerem administração injetável e supervisão clínica ou hospitalização durante o tratamento por causa dos possíveis efeitos secundários (CHAN-BACAB & PEÑA-RODRIGUEZ, 2001).

2. JUSTIFICATIVA

Entre os mais comuns fármacos disponíveis para tratar a leishmaniose visceral, estão os antimoniais pentavalentes. Contudo, apresentam várias inconveniências, como a via de administração, a ocorrência de falha terapêutica, tratamento prolongado, efeitos colaterais graves e o aparecimento de resistência ao tratamento, o que é, de longe, o maior problema do tratamento com os antimoniais na atualidade.

A administração de quimiocinas exógenas tem mostrado resultados promissores no tratamento das leishmanioses. Já foi relatado que a quimiocina CXCL10 é capaz de diminuir a carga parasitária de macrófagos infectados por *L. infantum* in vitro com produção de mediadores inflamatórios importantes para a cura da doença, como IFN- γ e NO. A proposta deste trabalho é, portanto, verificar o efeito de CXCL10 na infecção por cepa de *L. infantum* e a associação de CXCL10 com Glucantime, o fármaco padrão, uma vez que esta quimiocina é conhecida por favorecer o recrutamento e a ativação de células polarizadas para Th1, além de ativar células NK, macrófagos e células dendríticas, células cruciais para a resposta imunológica às leishmanioses.

Esta abordagem pode sugerir um potencial papel terapêutico desta quimiocina no controle da infecção por *L. infantum* e de outras espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, desta forma contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento científico e estudos em uma área de grande importância para a saúde pública.

3 OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar o efeito in vitro de CXCL10 e sua associação com antimônio (Glucantime) na infecção de macrófagos RAW 264 por cepa de *Leishmania infantum*.

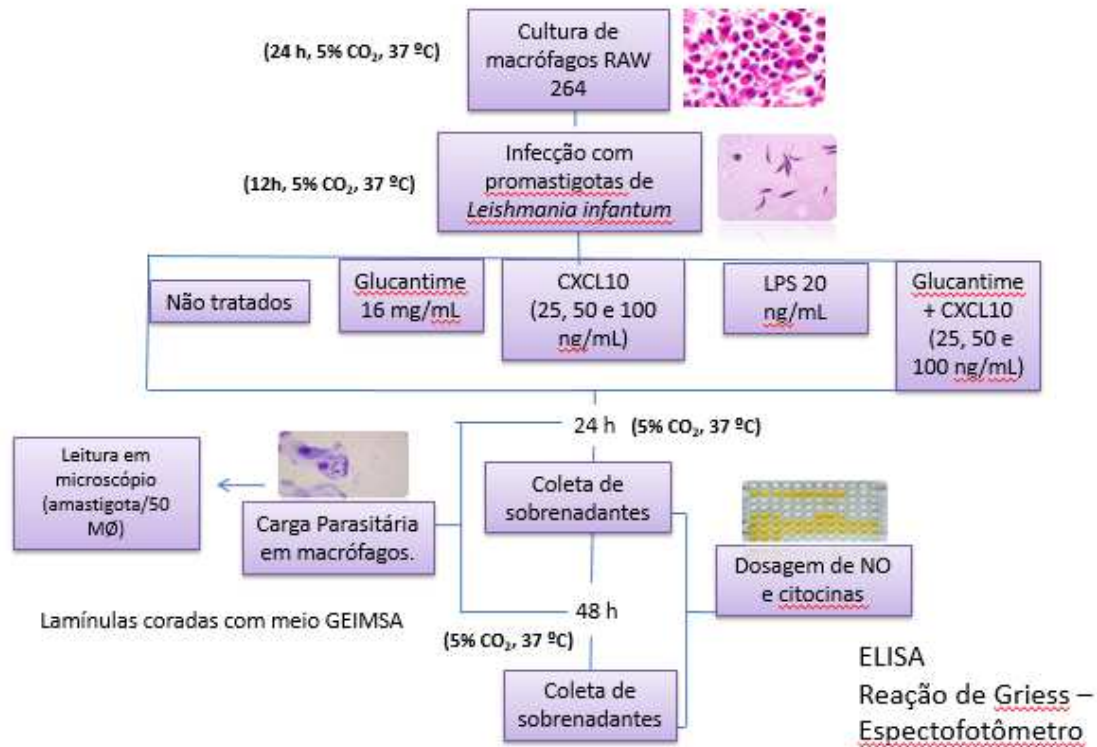
3.2. ESPECÍFICOS

Em macrófagos RAW 264 infectados por cepa de *L. infantum* e tratados com CXCL10, associado ou não com Glucantime:

1. Estimar a carga parasitária e a produção de citocinas e NO;
2. Relacionar as diferentes concentrações de CXCL10 com a carga parasitaria, produção de citocinas e NO.
3. Correlacionar a associação da quimiocina CXCL10 com Glucantime, em relação a carga parasitária, produção de citocinas e NO.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho Experimental



4.2 Reagentes e Meios de cultura

- CXCL10 recombinante de camundongo (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Reconstituído com água ultrapura (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) na concentração de 1 mg/mL. Aliquotas de 10 µg/mL foram conservadas a -20°C até o uso. Para os experimentos, a proteína foi diluída com RPMI para as concentrações de 25, 50 e 100ng/mL.

- Meio Schneider (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF – Gibco, Grand Island, NY), urina humana estéril a 2% e antibióticos (100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina). É mencionado como Schneider suplementado o meio contendo os componentes conforme descrito acima, e como Schneider aquele utilizado sem suplementos.

- Meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich). Suplementado com 20% de SBF, 50 µM de 2-mercaptoetanol, 2 mM L-glutamina, e antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de

estreptomicina). É mencionado como RPMI suplementado o meio contendo todos os componentes acima e como RPMI aquele utilizado sem suplementos.

- Meio Neal, Novy & Nicolle (N.N.N). Meio ágar-base com sangue a 10%, foi suplementado com meio Schneider e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina).

4.3 Parasitos

A cepa de *L. infantum* foi isolada de paciente com leishmaniose visceral. Os parasitos foram cultivados in vitro a 25°C em tubos de ensaio contendo meio N.N.N. e meio Schneider suplementado (Sigma-Aldrich). Para os experimentos, foram utilizadas promastigotas até a 5ª passagem de cultivo. As promastigotas foram submetidas a três ciclos de lavagem com salina estéril gelada, com centrifugação a 3.000 rpm, por 15 min a 4°C e ajustadas com meio RPMI para as concentrações desejadas em cada experimento. A viabilidade dos parasitos foi analisada pela motilidade dos mesmos ao microscópio óptico.

4.4 Isolamento, cultura, infecção e tratamento de macrófagos.

Cultura de macrófagos da linhagem RAW 264 foram submetidas à centrifugação de 1.500 rpm, por 15 min, a 5°C, e a suspensão de células foi ajustada em meio RPMI suplementado, em seguida, as células foram distribuídas em placas de 24 poços, cada poço contendo uma lamínula de vidro redonda de 23 milímetros, na concentração de 1×10^6 células/lamínula. Os macrófagos foram incubados por 24 h em estufa com 5% de CO₂ a 37°C e 95% de umidade. As células não aderidas foram removidas por lavagem com RPMI morno (37°C) (3 vezes) e cultivadas com meio RPMI suplementado na ausência ou presença de *L. infantum*, numa proporção de 10 parasitos para 1 célula (10:1) por 12 h, tempo suficiente para ocorrer a infecção. Os parasitos extracelulares foram removidos por lavagem (3 vezes) com RPMI morno (37°C) (KARMAKAR et al., 2011). Após esse período, as células foram tratadas com 16 µg/mL de antimônio pentavalente (Glucantime), CXCL10 (25, 50 e 100 ng/mL) e LPS (20 ng/mL; controle positivo) e em seguida, foram cultivadas durante 24h e 48h a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade. Os sobrenadantes das culturas foram coletados com 24h e 48h para a dosagem de citocinas e NO.

4.5 Determinação da taxa de infecção dos macrófagos

Para quantificar o nível de infecção dos macrófagos, as lamínulas contendo as células foram lavadas com salina, e em seguida, fixadas e coradas com meio GEIMSA (Sigma-Aldrich). As lamínulas coradas foram montadas em lâminas e examinadas em microscopia óptica a uma ampliação de 100x em óleo de imersão. Três áreas de 50 células cada uma foram examinadas e o número de macrófagos infectados/50 células foi determinado. Os tratamentos não foram determinados para o indivíduo que fez a contagem das lâminas (realizado de maneira cega).

4.6 Dosagem de citocinas

A produção de IL-4 e IL-10 nos sobrenadantes obtidos da cultura de células foi determinada utilizando-se a técnica ELISA, como recomendado pelo fabricante dos kits (BD Biosciences, San José, CA, USA). Brevemente, placas de 96 poços, fundo chato (Nunc), foram sensibilizadas por 12 a 18 h (dependendo da citocina testada) com o anticorpo de captura anti-citocina purificado na concentração determinada, a 4°C. A placa foi lavada, utilizando-se solução de lavagem (PBS com Tween 20 a 0,05%), e em seguida foi realizado bloqueio com PBS e soro bovino fetal (SBF 10%), seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS + Tween 20, foram adicionados o padrão e as amostras em duplicata e, em seguida, a placa foi incubada novamente por 2 h ou por uma noite à temperatura ambiente (dependendo da citocina testada). Após lavagem com PBS + Tween 20, a placa foi incubada por mais 1h com o anticorpo de detecção conjugado à enzima peroxidase. Após isso, a placa passou por nova lavagem e o substrato foi adicionado. A placa foi incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi finalizada com ácido fosfórico (1:20) e a leitura realizada em leitor de ELISA (Molecular Devices Corp.; Sunnyvale, CA, USA), usando filtro de 450nm. Os resultados foram analisados utilizando-se o programa Softmax PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

4.7 Dosagem de óxido nítrico (NO)

Sobrenadantes da cultura de macrófagos foram testados para detectar a liberação de NO sob a forma de nitrito (NO₂) pela reação de Griess (GREEN *et al.*, 1990). Os sobrenadantes em duplicata foram incubados com o reagente de Griess (1:1 v/v), recém-preparado, por 10 min à temperatura ambiente. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm e a concentração de NO₂ determinada usando uma curva padrão

de nitrito de sódio e expressa como $\mu\text{mol/mL}$. Para evitar interferência por NO_2 , possivelmente presente no meio, foi adicionado um branco para cada experimento, utilizando RPMI suplementado, meio utilizado na cultura das células.

4.8 Análise estatística

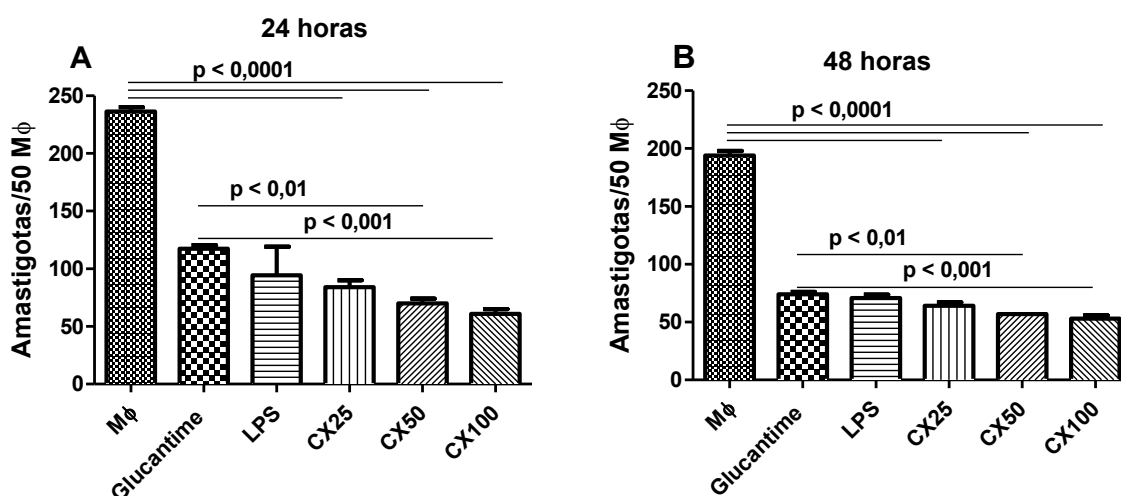
Para verificar a significância estatística entre os grupos tratados e o grupo controle foi aplicado o teste de normalidade e como houve distribuição normal, foi utilizado o teste Mann-Whitney. Para as comparações entre múltiplos grupos foi realizado o teste one-way ANOVA, seguido pelo post-test Bonferroni. Os testes foram realizados utilizando o Programa GraphPad Prism versão 5,0. Em todos os testes utilizados, a significância mínima foi aceita quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação do efeito de CXCL10 na infecção de macrófagos por *Leishmania infantum* in vitro.

A observação das lâminas obtidas mostrou que, após 24h, o tratamento com CXCL10, nas três concentrações utilizadas, resultou em uma redução estatisticamente significativa da carga parasitária que variou entre 64,4% a 74,0%, quando comparada com o controle não tratado (Figura 5A). No tempo equivalente, o resultado da associação de CXCL10 com Glucantime variou na redução da infecção dos macrófagos de 68,0% a 75,0%, mostrando semelhança ao tratamento com CXCL10 sozinho (Figura 6A).

FIGURA 5. Carga parasitária em macrófagos da linhagem RAW 264 infectados com *Leishmania infantum* e tratados com CXCL10.

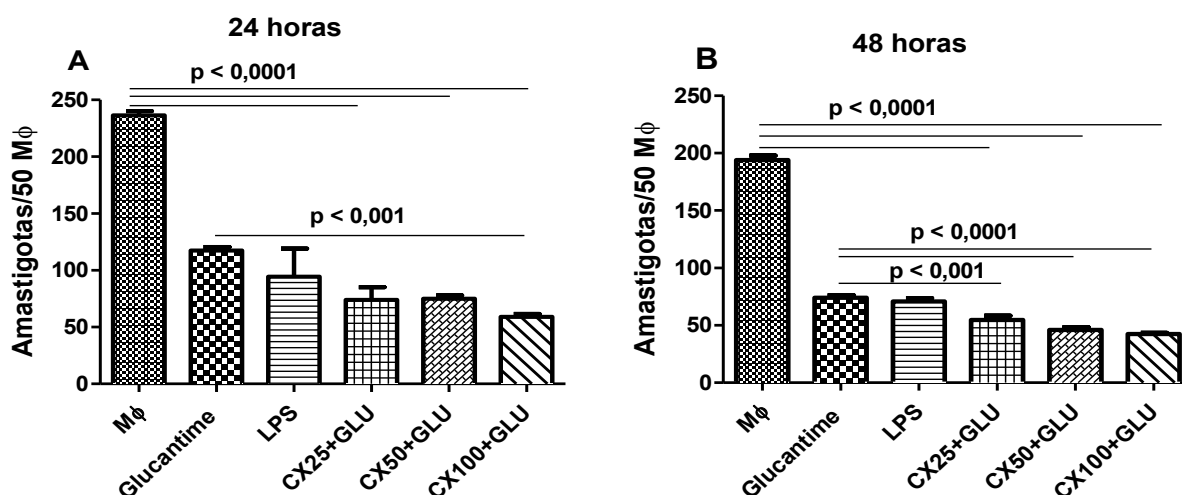


Fonte: Elaborado pelos autores. Macrófagos da linhagem RAW 264 foram infectados com promastigotas de *L. infantum* (10 parasitas: 1 macrófago). Após 12 h de infecção as células foram tratadas in vitro com CXCL10 (25, 50 e 100 ng/mL). Após 24 (A) e 48h (B) de incubação, o número de amastigotas por 50 macrófagos foi determinado em microscópio óptico. Os dados representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média. LEGENDA: Mφ – Macrófagos infectados com *L. infantum* sem tratamento; LPS – Lipopolissacarídeo; CX 25 – CXCL-10 (25ng/mL); CX 50 – CXCL-10 (50ng/mL); CX 100 – CXCL-10 (100ng/mL).

Na análise do tratamento com Glucantime, observou-se que houve redução na carga parasitária de 50,4% quando comparado ao controle no primeiro tempo avaliado. Vale salientar que CXCL10 sobressaiu-se em diminuir a infecção dos macrófagos nas

concentrações de 50 ng/mL (70,3%) e 100 ng/mL (74,0%) em comparação ao Glucantime (50,4%) (Figura 5A). A associação de CXCL10+Glucantime apresentou também esse mesmo efeito na redução da carga parasitária intracelular na concentração de 100 ng/mL (75,0%) (Figura 6A). Verificou-se que a associação de CXCL10+Glucantime nas concentrações de 25ng/mL e 50ng/mL obtiveram respostas semelhantes na redução de carga parasitária, com diminuição intracelular de 68% ambas, apesar de não haver significância em relação a Glucantime (50,4%).

FIGURA 6. Carga parasitária em macrófagos da linhagem RAW 264 infectados com *Leishmania infantum* e tratados com a associação de CXCL10+Glucantime.



Fonte: Elaborado pelos autores. Macrófagos da linhagem RAW 264 foram infectados com promastigotas de *L. infantum* (10 parasitas: 1 macrófago). Após 12 h de infecção as células foram tratadas in vitro com a associação de Glucantime (16 mg/mL) + CXCL10 (25, 50 e 100 ng/mL). Após 24 (A) e 48h (B) de incubação, o número de amastigotas por 50 macrófagos foi determinado em microscópio óptico. Os dados representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média. LEGENDA: Mφ – Macrófagos infectados com *L. infantum* sem tratamento; LPS – Lipopolissacarídeo; Glu – Glucantime; CX 25 – CXCL-10 (25ng/mL); CX 50 – CXCL-10 (50ng/mL); CX 100 – CXCL-10 (100ng/mL).

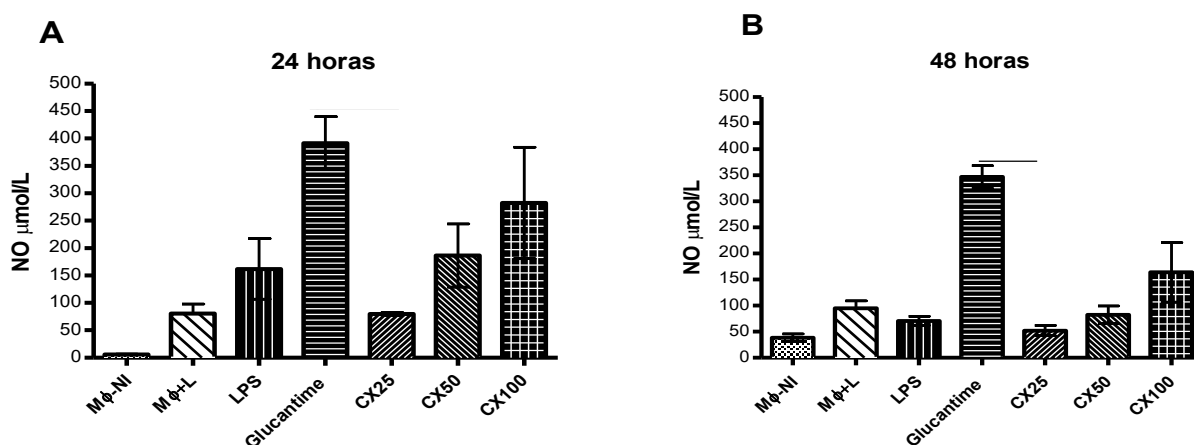
Após 48h do tratamento, os resultados mostraram que CXCL10 manteve a redução no número de parasitos intracelulares, nas concentrações utilizadas ([25ng/mL;67,0%], [50ng/mL;70,0%], [100 ng/mL; 72,6%]) quando comparados com o controle (Figura 5B). CXCL10 apresentou melhor redução nas concentrações de 50ng/mL (70%) e 100 ng/mL (72,6%) quando comparadas a Glucantime (61,8%). Interessante ressaltar que no tempo

avaliado, na concentração de 100ng/mL, CXCL10 reduziu 21 vezes mais o número de parasitos intracelulares que Glucantime. A associação de CXCL10+Glucantime se comportou como no primeiro tempo avaliado, mantendo uma significativa maior redução de parasitos (Figura 6B).

5.2 Produção de óxido nítrico por macrófagos infectados por *Leishmania infantum* in vitro e tratados com CXCL10

Ao se analisar os sobrenadantes das amostras de 24 horas, observou-se que a produção de NO se comportou de forma dose-dependente nas amostras onde CXCL10 foi utilizado sozinho, com uma média de produção variando entre 79 $\mu\text{mol/L}$ a 282,3 $\mu\text{mol/L}$. Mesmo não havendo significância em relação a Glucantime (391,5 $\pm$ 48,40), observou-se uma tendência a uma maior produção de NO a medida que a concentração da quimiocina foi aumentada (Figura 7A).

Figura 7. Produção de óxido nítrico por macrófagos infectados com *Leishmania infantum* e tratados com CXCL10.

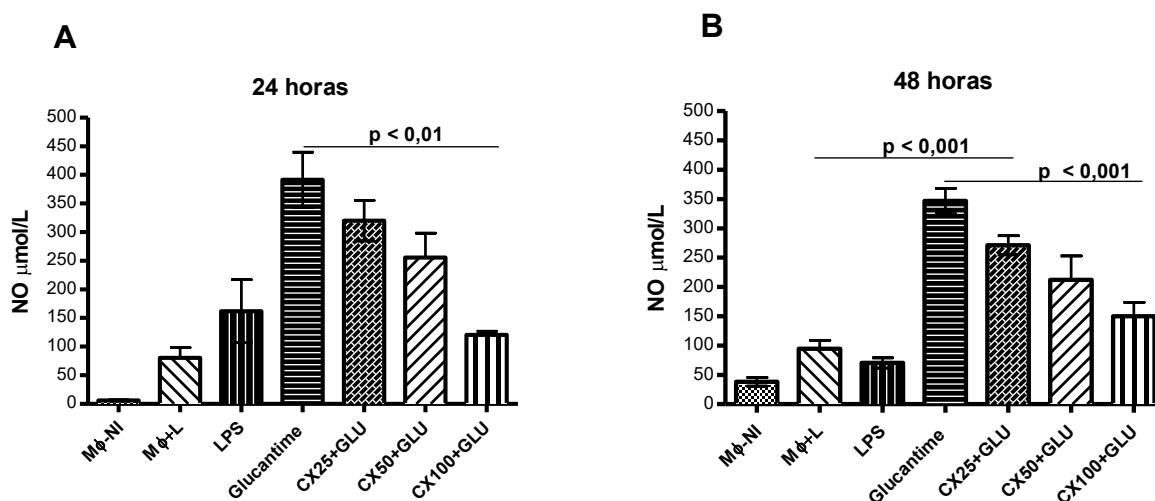


Fonte: Elaborada pelos autores. Macrófagos da linhagem RAW 264 foram infectados com *L. infantum* (10 parasitos: 1 macrófago). Após 12 h de infecção as células foram tratadas in vitro com CXCL10 (25, 50 e 100 ng/mL), LPS (20 ng/mL) e Glucantime (16 mg/mL). Os sobrenadantes das culturas foram coletados com 24 (A) e 48 (B) h para a dosagem de NO. Os dados representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média. LEGENDA: Mφ = Macrófagos; NI = Não Infectados; L = *Leishmania infantum*; LPS – Lipopolissacarídeo; CX 25 – CXCL-10 (25ng/mL); CX 50 – CXCL-10 (50ng/mL); CX 100 – CXCL-10 (100ng/mL).

Os sobrenadantes de 48 horas demonstraram uma redução da produção de NO em todas as amostras, ainda assim, prevalecendo uma maior síntese de NO quando as células foram tratadas com Glucantime (346,7 $\pm$ 21,89). As amostras se comportaram como no

primeiro tempo avaliado, onde CXCL10 obteve médias de produção variando entre 52,0 $\mu\text{mol/L}$ a 164,0 $\mu\text{mol/L}$; mostrando que continuou havendo dose-dependência, embora não tenha sido significativa em relação a Glucantime (Figura 7B).

Figura 8. Concentração de óxido nítrico por macrófagos infectados com *Leishmania infantum* e tratados com a associação de Glucantime+CXCL10.



Fonte: Elaborada pelos autores. Macrófagos da linhagem RAW 264 foram infectados com *L. infantum* (10 parasitas: 1 macrófago). Após 12 h de infecção as células foram tratadas in vitro com a associação de Glucantime (16 mg/mL) + CXCL10 (25, 50 e 100 ng/mL), LPS (20 ng/mL) e Glucantime (16 mg/mL). Os sobrenadantes das culturas foram coletados com 24 (A) e 48 h (B) para a dosagem de NO. Os dados representam a média aritmética $\pm$ erro padrão. LEGENDA: Mφ = Macrófagos; NI = Não Infectados; L = *Leishmania infantum*; LPS – Lipopolissacarídeo; GLU = Glucantime; CX 25 – CXCL-10 (25ng/mL); CX 50 – CXCL-10 (50ng/mL); CX 100 – CXCL-10 (100ng/mL).

Quando se analisou a associação de Glucantime + CXCL10, observou-se após 24 horas uma dinâmica diferente, onde, a medida que a concentração da quimiocina aumentou, houve diminuição da produção de NO. A associação de Glucantime + CXCL10 de 25ng/mL obteve uma média ($320,2 \pm 35,28$) que decaiu 3 vezes ao chegar na concentração de 100ng/mL ($120,7 \pm 5,99$), enquanto o Glucantime sozinho apresentou média $346,7 \pm 48,4$ (Figura 8A).

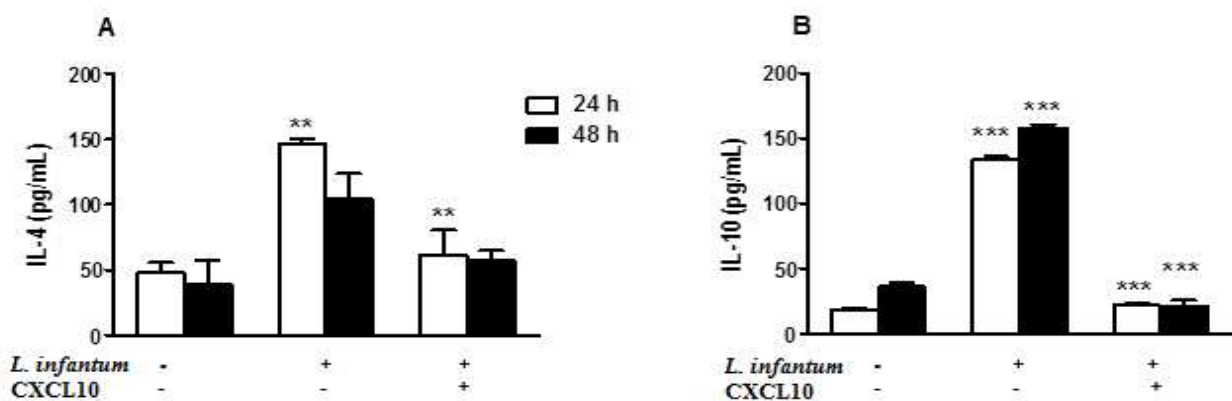
Após 48 horas, as amostras se comportaram como no primeiro tempo avaliado (Figura 8B), tendo Glucantime como o maior indutor da produção de NO ($346,7 \pm 21,89$). Quando a associação CXCL10 + Glucantime foi utilizada, observou-se que a produção de NO foi

diminuindo a medida que a concentração da quimiocina aumentou (25 ng/mL = $271,4 \pm 16,31$; 100 ng/mL = $150 \pm 23,82$).

5.3 Produção de citocinas anti-inflamatórias

Em relação às citocinas anti-inflamatórias, os resultados mostraram que a infecção por *L. infantum*, seguida pelo tratamento com CXCL10 (100 ng/mL) inibiu a produção de IL-4, sendo estatisticamente significativa apenas com 24 h pós-infecção ($p < 0,01$), e inibiu também a secreção de IL-10 ($p < 0,001$) nos dois tempos avaliados (Fig. 9A e B). Os sobrenadantes obtidos com 48h após infecção apresentaram resultados similares, tanto para IL-4 como para IL-10 (Fig. 9A e B).

Figura 9. Produção de IL-4 e IL-10 por macrófagos infectados com *Leishmania infantum* e tratados com CXCL10.



Fonte: Elaborada pelos autores. Macrófagos da linhagem RAW 264 foram infectados com *L. infantum* e, após 12h, tratados em vitro com CXCL10 (100 ng/mL). Os sobrenadantes das culturas foram coletados com 24 (A) e 48 h (B) para a dosagem de citocinas. Os dados representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média. Cada grupo foi comparado com o controle infectado e não tratado (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Após 24h de infecção, ocorreu uma indução 3 vezes maior na produção de IL-4 ($p < 0,01$) e IL-10 ($p < 0,001$) pelas células parasitadas quando comparado com aquelas não infectadas (Fig. 5A e 5B). Com 48 h após infecção, apenas IL-10 continuou com produção aumentada nas células parasitadas ($p < 0,001$).

6. DISCUSSÃO

Leishmania infantum suporta o compartimento hostil e tóxico de fagolisossomos de macrófagos por evasão e atenuação das funções microbidas do hospedeiro (CECILIO et al., 2014). *Leishmania* tem evoluído como um parasito bem-sucedido, principalmente pela sua capacidade em modular a resposta imunológica e citoquímica do hospedeiro após a infecção. A estratégia chave para o sucesso da patogênese é a de subverter a ação das substâncias microbidas, como o óxido nítrico, produzidas pelo macrófago infectado. Este parasito oportunista estabelece, assim, um nicho seguro nos fagócitos inativados e um parasitismo descontrolado no fígado, no baço e na medula óssea, levando a um quadro de LV sintomática, caracterizada por febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia (PALATINIK-DE-SOUSA, 2012).

O início de uma resposta imunológica apropriada é um desafio para o controle da infecção por *Leishmania*. Recentes abordagens como a terapia de combinação, a administração orientada e uso de adjuvantes imunológicos são esforços para reduzir as doses eficazes de fármacos disponíveis no mercado associados à toxicidade (SINGH et al., 2014).

Neste trabalho foi avaliado o potencial da quimiocina CXCL10 em controlar a infecção causada por *L. infantum*, utilizando um modelo in vitro de leishmaniose visceral. CXCL10 na concentração de 100 ng/mL foi capaz de reduzir em 74,0% a carga parasitária intracelular em relação a macrófagos infectados e não tratados, e essa redução foi 56x maior do que aquela induzida pelo estímulo com Glucantime. O provável mecanismo efector desta redução da carga parasitária está relacionado à ativação do macrófago pela quimiocina e a eventual produção de NO, substância que medeia a ação de macrófagos ativados na destruição dos parasitos intracelulares. A produção de NO aumentou consideravelmente em macrófagos infectados e tratados com CXCL10, em comparação àqueles infectados e não tratados com a quimiocina.

Trabalhos relatam que pacientes com LV apresentam concentrações elevadas de CXCL9 e CXCL10 no seu soro durante a infecção ativa, e tem sido sugerido que estas quimiocinas desempenham um papel importante, juntamente com IFN- γ na doença (HAILU et al., 2004). Estudos envolvendo cães que são naturalmente ou experimentalmente infectados com *L. infantum*, demonstraram que esses animais possuíam RNAm de CXCL10 excessivamente expresso no baço, levando a uma resposta imunológica do tipo Th1 (STRAUSS-AYALI et al., 2007). Uma análise detalhada da expressão de quimiocinas em amostras de pele de cães naturalmente infectados com *L. infantum* demonstrou densidade

aumentada do parasito e uma correlação positiva com CCL2, CCL4, CCL5, CCL21 e CXCL8 (MENEZES-SOUZA et al., 2012). Nota-se que algumas quimiocinas, tais como CCL2 e CXCL10 podem ativar macrófagos para participar na redução do número de parasitos (RITTER et al., 2000). Os macrófagos medeiam a destruição de *Leishmania* em seu interior via derivados reativos de oxigênio e NO, principalmente (VOULDOUKIS, et al., 1997).

Trabalhos têm mostrado que em modelos murinos de infecção com *L. major*, IFN- γ apresentou ação sinérgica com TNF- α , outra citocina derivada de macrófagos, e juntas, elas ativam macrófagos, levando ao aumento da expressão de iNOS – óxido nítrico sintase induzível, enzima que catalisa a síntese de NO a partir da arginina, um potente agente microbicida que leva à morte de parasitos intracelulares e outros microorganismos (LIEW; WEI; PROUDFOOT, 1997; BOGDAN; ROLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000). Mais recentemente, há trabalhos mostrando que algumas espécies de *Leishmania* são resistentes à ação microbicida de NO, como alguns isolados de *L. braziliensis*, que exibiram significativo crescimento intracelular mesmo na presença de LPS e IFN- γ , substâncias que usualmente ativam macrófagos (SOUZA et al., 2010).

Estudos demonstraram que NO desencadeia a morte de amastigotas de *Leishmania* através da indução de apoptose nestes parasitos (HOLZMULLER et al., 2002), e um fenótipo de amastigotas de *L. infantum* se provou resistente à morte apoptótica mediada por NO (HOLZMULLER et al., 2006). Assim sendo, a alta concentração de NO obtida em macrófagos tratados com CXCL10 no presente trabalho pode não ser indicativa direta da morte dos parasitos, já que em alguns casos os parasitos conseguem se evadir da destruição mediada por NO. Esse fato foi observado na associação de CXCL10+Glucantime, onde não houve produção significativa de NO em relação ao Glucantime sozinho, contudo houve uma importante redução na carga parasitária, observando-se que CXCL10 na concentração de 100ng/mL reduziu 21 vezes mais a infecção intracelular que Glucantime.

Nos dois tempos avaliados, CXCL10 + Glucantime não induziu a produção de NO em macrófagos em níveis comparáveis aqueles observados para as células tratadas apenas com Glucantime, e isto sugere o envolvimento de outros mecanismos na morte de *L. infantum* após o tratamento com a associação. Na literatura, há relatos de que outros produtos do metabolismo do oxigênio envolvidos na explosão respiratório em macrófagos murinos ativados, tais como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ânion superóxido (O₂⁻) também estariam implicados na eliminação de *Leishmania* (ASSCHE et al., 2011).

Ao se avaliar a associação CXCL10+Glucantime, à medida que se aumentou a dose da quimiocina, percebeu-se a redução da produção de NO, onde as médias de Glucantime e da

associação de Glucantime+CXCL10 (100ng/mL) apresentaram redução de 346,7 a 150, 2; respectivamente, sugerindo que essa associação causou inibição da produção de NO. Não há na literatura nenhuma referência a inibição do efeito da associação de Glucantime com outros fármacos ou citocinas.

Corroborando com a resposta protetora representada pelo aumento da produção de NO, o tratamento com CXCL10 induziu diminuição significativa de IL-10, citocina anti-inflamatória e presente em altos níveis na fase ativa da doença, e de IL-4, citocina de assinatura da resposta tipo Th2, sugerindo um papel protetor de CXCL10 na mediação da polarização da resposta imunológica; de Th2 para Th1 em macrófagos infectados com *L. infantum*.

O estabelecimento das leishmanioses tem sido relacionado à polarização de resposta de células T CD4⁺ subtipo Th2. Camundongos BALB/c infectados com *L. major* se mostram incapazes de controlar a disseminação do parasito e o desenvolvimento da doença acaba levando o animal à morte. Esta incapacidade de controlar a doença está relacionada com a resposta precoce do tipo Th2, que se inicia e se mantém a partir de células T CD4⁺ secretoras de IL-4, resultando em ativação de células B policlonais (CHATELAIN; VARKILA; COFFMAN,1992).

A aparente cura de infecções por *L. major* em camundongos BALB/c tratados durante o curso da infecção com anticorpos monoclonais anti-IL-4 (SADICK et al., 1990) ou em camundongos knockout para IL-4 (KOPF et al., 1996), fornecem sólidas evidências de que a produção precoce de IL-4 polariza a resposta imunológica para Th2, que é responsável por suprimir o desenvolvimento de células Th1 e por consequência também o alto nível de secreção de IFN- γ requerido para a ativação de macrófagos infectados. Entretanto, em pacientes portadores de LV, há um aumento no nível de produção de múltiplas citocinas e quimiocinas, e muito da resposta parece ser pró-inflamatória, como é indicado pelo elevado nível plasmático de IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, CXCL10, IFN- γ e TNF- α (DE MEDEIROS et al., 1998; ANSARI et al., 2006; KURKJIAN et al., 2006; VIANA, 2010).

A citocina que se opõe à cura em leishmaniose e encontrada mais comumente em pacientes com evolução clínica não é IL-4 e sim IL-10 (SACKS; ANDERSON, 2004; VIANA, 2010). IL-10 é outra citocina produzida por macrófagos que contribui para a sobrevivência de *Leishmania* nestas células, relacionado como o fator mais potente para a patogênese de LV. IL-10 inibe a síntese de citocinas produzidas por macrófagos, tais como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α (DE WALL et al., 1991) e reduz a função de apresentação de antígenos nestas células através da diminuição da expressão de moléculas de MHC classe II

(DE WALL et al., 1991). A associação de IL-10 e LV em seres humanos com doença ativa é bem estabelecida (NYLEN et al., 2007). IL-10 é uma citocina regulatória que pode ser produzida por células T, B, macrófagos, células dendríticas e epiteliais, e acredita-se que seja induzida como uma resposta de equilíbrio homeostático que protege tecidos de dano colateral causado por inflamação excessiva (MOORE et al., 2001; MEGE et al., 2006).

Na LV, a imunossupressão mediada por citocinas é dominada por IL-10 e TGF- β (MURRAY et al., 2002). Estudos envolvendo murinos deficientes em IL-10 mostraram que estes são altamente resistente à LV (MURRAY et al., 2002; KAYE et al., 2004). Esta citocina também prejudica a capacidade de resposta para antimônios pentavalentes. Em modelos experimentais de LV, o tratamento com anticorpos monoclonais contra o receptor de IL-10 permitiu uma redução de 10 vezes na eficácia da dose de antimônios pentavalentes em comparação com o fármaco por si só, bem como considerável encurtamento do tempo necessário para uma terapia eficaz (MURRAY et al., 2002; SHAKYA et al., 2012). Inibição de TGF- β foi demonstrada diminuir a carga de parasitos em LV experimental; no entanto, o bloqueio de TGF- β não tem aparente efeito sobre a atividade dos antimônios (SHAKYA et al., 2012).

Com base em estudos do modelo de infecção de *L. major* em camundongos BALB/c, a desregulação imunológica associada com a não-cura e formas disseminadas de leishmaniose foram apontadas como uma resposta polarizadas para Th2, impulsionado o crescimento do parasito, onde IL-4 é especialmente dominante (STAGER et al., 2010). A acumulação de dados em LV humana, no entanto, indicam que as respostas de citocinas não são altamente polarizadas, e mesmo durante a fase aguda da doença, níveis elevados de mRNA de IFN- γ foram encontradas no tecido da lesão, tais como o baço e medula óssea (BACELLAR et al., 1996; NYLEN et al., 2010). Além disso, em LV humana, a superprodução de IL-10 proporciona uma melhor correlação com a susceptibilidade à doença do que IL-4. A principal atividade promotora da doença desempenhada por IL-10 é aquela relacionada aos macrófagos, que podem se tornar não responsivos a sinais de ativação, inibindo a morte de amastigotas dentro dos fagolisossomos, pela diminuição da produção de TNF- α e NO (WU et al., 1993; VOULDOUKIS et al., 1997).

Estudos com quimiocinas CC in vitro e in vivo demonstraram restauração da resposta efetora, indicando que estas moléculas desempenham importante papel em restringir a progressão da infecção por *Leishmania* (DEY et al., 2007). CXCL10, por exemplo, estimula a produção de citocinas de perfil Th1 em infecção por *L. amazonensis* (VASQUEZ; SOONG, 2006) e desempenha importante papel imunoprotetor em modelos in vitro e in vivo de *L.*

donovani, direcionando a resposta imunológica para uma resposta efetora pró-inflamatória (GUPTA *et al.*, 2009).

Em resumo, os dados apresentados neste trabalho fornecem evidências sobre o papel de CXCL10 em direcionar a resposta imunológica para um perfil protetor, em um modelo *in vitro* de LV por *L. infantum*. O tratamento de macrófagos infectados por *L. infantum* realizado com esta quimiocina sugere a indução de resposta imunológica pró-inflamatória, mediada por NO, normalmente suprimido pelo parasito para sobreviver às condições hostis no interior do fagolisossomo. Por outro lado, as citocinas, cujas expressões estão tipicamente relacionadas ao estabelecimento da doença em modelos de LV, IL-4 e IL-10, tiveram suas produções diminuídas após o tratamento com CXCL10. Uma vez que IL-10 inibe NO (BHATTACHARYYA, 2001), a regulação do balanço de citocinas pró e anti-inflamatórias por CXCL10 pode exercer um papel crítico para o controle ou desenvolvimento da doença (DIEFENBACH, 1999). A associação de CXCL10 com Glucantime gerou inibição na produção de NO, sugerindo que outros mediadores podem estar controlando a parasitemia intracelular, visto que houve redução da carga parasitária mesmo com a baixa produção de NO.

7. CONCLUSÃO

Em macrófagos RAW 264 infectados por cepa de *Leishmania infantum* e tratados com a quimiocina CXCL10 in vitro, é possível concluir que o tratamento com a quimiocina reduziu a carga parasitária intracelular em macrófagos após 24 h e 48h de infecção, mediado por óxido nítrico e sugerindo a participação de outros mediadores envolvidos. Além disso, o tratamento com CXCL10 reduziu a produção de IL-4 e IL-10, sugerindo uma imunomodulação da resposta inflamatória. O tratamento com a associação Glucantime + CXCL10, embora tenha reduzido a carga parasitária intracelular, inibiu a produção de óxido nítrico de uma maneira dose-dependente, sugerindo que a redução nos números de parasitos deve ser mediada por outros mecanismos. Os dados deste trabalho sugerem um promissor efeito imunomodulador da quimiocina CXCL10, e um efeito protetor quando associada a Glucantime, na infecção por *L. infantum*.

REFERÊNCIAS

- ABRAMS, J. et al. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **Journal of Experimental Medicine** 174: 1209-1220, 1991.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M.; WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. **Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence**. PLoS ONE, v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012.
- ARNOLDI, J.; MOLL, H. Langerhans cell migration in murine cutaneous leishmaniasis: regulation by tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and macrophage inflammatory protein-1 alpha. **Dev. Immunol.** 6, 3–11, 1998.
- ATTA, AM. et al. Anti-leishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 59: 426-430, 1998.
- BACELLAR, O; LESSA, H; SCHRIEFER, A; MACHADO, P; RIBEIRO, DE JESUS A; DUTRA, W. O; GOLLOB, K. J.; CARVALHO, E. M. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infectious Immunology**, n. 70, p.6734-40, 2002.
- BALANA-FOUCE, R. et al. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen. Pharmacol.** 1998.
- BARRAL-NETO, M. et al. Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases** 163: 853-857, 1991.
- BERMAN, J.D.; WADDELL, D; HANSON, B.D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.27, p.916-920, 1985.
- BERMAN, J.D.; GALLALEE, J.V.; BEST, J.M. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. **Biochem Pharmacology**, v.36, p.197-201, 1987.
- BERMAN, J.D.; EDWARDS, N; KING, M; GROGL, M. Biochemistry of Pentostam resistant *Leishmania*. **Am J Trop Med Hyg**, v.40, p.159-164, 1989.
- BERMAN, J. D.; WYLER, D. J. An in vitro model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. **J. Inf. Diseases**, 1980.
- BODGAN, C. Rollinghoff M, Diefenbach A. **The role of nitric oxide in innate immunity**. Immunology Review 173: 17-26, 2000.
- BONECCI, R. et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. **J. Exp. Med.** 187, 129–134. 1998.
- BRANDONISIO, O; PANARO, M.A; FUMAROLA, I; SISTO, M; LEOGRANDE, D; ACQUAFREDDA, A; SPINELLI, R.; MITOLO, V. Macrophage chemotactic protein-1 and

macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. **Clin Exp Med**, v.2, n.3, p.125-9, Nov 2002.

CARVALHO, EM et al. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. **Journal of Clinical Investigation** 83: 860-864, 1989.

CARVALHO, EM et al. Visceral leishmaniasis: a disease associated with inability of lymphocytes to activate macrophages to kill leishmania. **Brazilian Journal of Medical Diseases** 6: 22-27, 1985.

CASTELLANO, L.R.C. Anti-*Leishmania* immune response and evasion mechanisms, **VITAE Academia Biomédica Digital**, n. 25 Oct - Dez 2005. Disponível em <<http://caibco.ucv.ve>>. Acesso em 21 de maio de 2015.

CENINI, P. et al. Mononuclear cell subpopulations and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. **Journal of Infectious Diseases** 168: 986- 993, 1993.

COTTERELL, S.E. et al. *Leishmania donovani* infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a cell-dependent manner. **Eur. J. Immunol.** 29, 203–214. 1999.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 101: 117-118, 2006.

DE WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **Journal of Experimental Medicine** 174: 915-924, 1991.

DING, A. et al. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. **Journal of Immunology** 145: 940-944, 1990.

DOREA, J. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Clin. Chem.** 1987.

DUTRA, M. et al. Renal involvement in visceral leishmaniasis. **American Journal Kidney Biological Research** 21: 85-92, 1988.

FARBER, J.M. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. **J. Leukoc. Biol.** 61, 246–257. 1997.

FIOCRUZ. Leishmanioses no Brasil: diagnóstico e tratamento. Rio de Janeiro: **Campus Virtual de Saúde Pública**, 2015.

GHALIB, HW. et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **Journal of Clinical Investigation** 92: 324-329, 1993.

HAILU, A. et al. Elevated plasma levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-gamma inducing cytokines, and IFN-gamma inducible CXC chemokines in visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, 71(5):561–7. 2004.

HOLADAY, BJ. et al. Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kala azar. **Journal of Clinical Investigation** 92: 2626-2632, 1993.

KALANTARI, H; HEMMATI, A; BAVARSAD, N; REZAIE, A; AHMADI, S. Effect of topical Nanoliposomes of Paromomycin on Rats Liver and Kidney. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v.9, n.4, Nov, 2014.

KARP, CL. et al. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. **Journal of Clinical Investigation** 91: 1644-1648, 1993.

KAYE, P.M. et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunol. Rev.** 201, 239–253. 2004.

KEMP, M. et al. Leishmania donovani-reactive Th1- and Th2-like T-cell clones from individuals who have recovered from visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity** 61: 1069-1073, 1993.

MAURÍCIO IL, STOTHARD JR, MILES MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol. Today**. 2000, 16(5):188-9.

MICHALICK, M.S.M; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. (Ed) **Parasitologia humana**. 11º ed., Ed. Atheneu, São Paulo, 2005. p. 56-72.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da saúde, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Visceral**. Rio de Janeiro, 2015.

MOSMANN, TR. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology** 136: 2348-2357, 1986.

MURRAY, HW. et al. Killing of intracellular Leishmania donovani by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. **Journal of Clinical Investigation** 72: 1506-1510, 1983.

NEVES, David Pereira et al. **Parasitologia Humana**. 11. ed. Belo Horizonte: Atheneu, 2005.

OHMORI, Y. et al. Tumor necrosis factor-alpha induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokines in vivo. **Am. J. Pathol.** 142, 861–870. 1993

OLIVEIRA, M.R.; TAFURI, W.L.; AFONSO, L.C.C.; OLIVEIRA, M.A.P.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C.; SCOTT, P.; MELO, M.N.; VIEIRA L.Q. Germ-free mice produce high levels

of interferon-gamma in response to infection with *Leishmania major* but fail to heal lesions. **Parasitology**, v.131, pp. 477–488, 2005.

PALATNIK-DE-SOUSA, Clarisa B.. Vaccines for Canine Leishmaniasis. **Front. Immun.**, [s.l.], v. 3, p.6-7, 2012.

PALOMINO, D.C.T; MARTI, L.C. Chemokines and immunity. **Einstein (são Paulo)**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.469-473, set. 2015.

PEDROSA, C. et al. Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis: evidence for predominance of endogenous interleukin 4 over interferon-gamma production. **Clinical Immunology Immunopathology**, 57: 242-249, 1990.

PISCOPO TV, MALLIA C. Leishmaniasis. **Postgrad Med. J.** 2006, 82:649-57.

RATH, S.; JARDIM, W. F.; DOREA, J. G. A simple spectrophotometric procedure for the determination of antimony (III) and (V) in antileishmanial drugs. **Fresenius' J. Anal. Chem.** 1997.

ROBERTS, W. L.; MCMURRAY, W. J.; RAINEY, P. M.; **Antimicrob. Agents Chemother.** 1998

ROUSSEAU, D. et al. Sustained parasite burden in the spleen of *Leishmania infantum*-infected BALB/c mice is accompanied by expression of MCP-1 transcripts and lack of protection against challenge. **Eur. Cytokine Netw.** 12, 340–347 54. 2001.

SACKS, D. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu. Rev. Microbiol.** 55, 453–483. 2001.

SANTOS-GOMES, G.M.; CAMPINO, L.; ABRANCHES, P. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 95: 193-198. 2000.

SCHNORR, D; MUNIZ, A.C.; PASSOS, S; GUIMARAES, L.H.; LAGO, E.L.; BACELLAR, O; GLESBY, M.J.; CARVALHO, E.M. IFN- γ Production to *Leishmania* Antigen Supplements the *Leishmania* Skin Test in Identifying Exposure to *L. braziliensis* Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 12, p.1947, December, 2012.

SILVA, A.G.; BITTAR, R.C.; NOGUEIRA, R.S.; AMATO, V.S.; MATTOS, M.S.; NETO, M.P.O.; COUTINHO, S.G.; CRUZ, A.M.; Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection?. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 149, n. 3, p. 440–444, September, 2007.

SINGH, Om Prakash; SUNDAR, Shyam. Immunotherapy and Targeted Therapies in Treatment of Visceral Leishmaniasis: Current Status and Future Prospects. **Front. Immunol.**, [s.l.], v. 5, p.6-7, 26 jun. 2014

STRAUSS-AYALI, D; BANETH, G, JAFFE, CL. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Vet Res.** 2007.

SOUSA, Tatyere Constâncio de et al. Leishmaniose Canina em Brasília, DF: Uma Revisão da Literatura. *Tempus Actas de Saúde Coletiva*, Brasília, v. 3, n. 9, p.187-202, set. 2015.

TEIXEIRA, Maria Jania et al. Chemokines in host–parasite interactions in leishmaniasis. **Trends In Parasitology**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.32-40, jan. 2006. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S1471492205003168?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 02 de junho de 2015.

TRINCHIERI G., GEROSA F. Immunoregulation by interleukin- 12. **Journal of Leukocyte Biology** 59: 505-511, 1996.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immuneresponse to leishmania:paradox rather than paradigm. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.51, p.229–242, 2007.

WILSON ME, JERONIMO SM, PEARSON RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microb. Pathog.** 2005, (4): 147-60.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Leishmaniasis**. Technical Report Series, v. 793, p. 50-52, 2014.

ZAPH, C.; SCOTT, P. Interleukin-12 regulates chemokine gene expression during the early immune response to *Leishmania major*. **Infect. Immun.** 71, 1587–1589. 2003.