



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA

PRISCILLA NASCIMENTO DOS SANTOS

EFEITO IN VITRO DA ASSOCIAÇÃO DE CXCL10
COM GLUCANTIME® EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 INFECTADOS
POR *Leishmania infantum*

FORTALEZA-CE

2018

PRISCILLA NASCIMENTO DOS SANTOS

EFEITO IN VITRO DA ASSOCIAÇÃO DE CXCL10
COM GLUCANTIME® EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 INFECTADOS
POR *Leishmania infantum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Jania
Teixeira

FORTALEZA-CE

2018

PRISCILLA NASCIMENTO DOS SANTOS

EFEITO IN VITRO DA ASSOCIAÇÃO DE CXCL10 COM GLUCANTIME®
EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 INFECTADOS POR *Leishmania infantum*

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria Jania Teixeira (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Ticiania Monteiro Abreu
Faculdade Integrada da Grande Fortaleza (FGF)

Prof.^a Dr.^a Milena Aguiar Braga
UNICE

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)

S237e Santos, Priscilla Nascimento dos.
EFEITO IN VITRO DA ASSOCIAÇÃO DE CXCL10 COM GLUCANTIME® EM MACRÓFAGOS
RAW 264.7 INFECTADOS POR *Leishmania infantum* / Priscilla Nascimento dos Santos. – 2018.
52 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Maria Jania Teixeira.

1. *Leishmania infantum*. 2. Macrófagos. 3. Citocinas. 4. Óxido nítrico. I. Título.

CDD 571.9

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças para atravessar todas as dificuldades e me ensinado a não desistir.

Aos meus pais Vanderley Alexandre dos Santos e Lúcia de Fátima Nascimento dos Santos, que sempre me motivaram e ensinaram a manter meus sonhos e conseguir todos os meus objetivos.

À amiga e presente que Deus me deu, Kayanny Queiroz Ferreira, por toda a força, acompanhamento, por ser a melhor psicóloga e confidente durante esses mais de 8 anos de amizade, estudo e companheirismo.

À minha orientadora, Prof^a. Maria Jania Teixeira, pela ajuda no desenvolvimento dessa pesquisa e pela paciência para me ensinar e ajudar no meu crescimento profissional.

Às minhas amigas da graduação que acompanharam minha caminhada, Renata de Araújo e Silva, Ilana Carneiro Lisboa Magalhães, Daislany Andreia da Silva Alves e Eduarda Nattaly Ferreira Nobre Santos.

Às minha amigas e companheiras de sempre, Flaviana Castelo Branco Carvalho de Sousa, Ilana Paz Ferreira, Libiane Ferreira da Costa, Ana Suelen Portela Caitano e Cássia Catelyne Ferreira Couras.

A todos os graduandos, mestrandos, doutorandos e técnicos administrativos que fizeram e fazem parte do Laboratório de Parasitologia da UFC, Naya Lúcia de Castro Rodrigues, Weberty Mayk Eufrásio Figueiredo, Thially Braga Gonçalves, Genil Mororó Araújo Camelo Júnior, Rafaelle de Paula Freire, Francisco Rafael Marciano Fonseca, Aline Sombra Santos, Carrel Xavier Martins Lima, Pedro Delcy Torres Sindeaux Filho, Dorotheia Teixeira Alves, Fabíola Fernandes Heredia, Alan Rodrigo Soares Maia, Quintino Gomes, pela paciência em sempre ensinar, ajudar nos experimentos e por passar experiências valiosas.

À CAPES pelo apoio financeiro durante a pós-graduação.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, meu muito obrigada!

RESUMO

Leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave das leishmanioses causada por parasitos do gênero *Leishmania*, e tem como característica a perda da habilidade do hospedeiro em gerar uma resposta imunológica eficaz. As quimiocinas têm um envolvimento direto na patogênese das leishmanioses, e podem potencialmente serem utilizadas como adjuvantes no tratamento dessas doenças. CXCL10 é uma quimiocina que tem mostrando resultados promissores no tratamento de leishmaniose. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito in vitro da associação de CXCL10 com Glucantime®, em macrófagos RAW 264.7 infectados por *L. infantum*. Os macrófagos foram infectados por *Leishmania infantum* e tratados ou não com CXCL10 (25, 50 e 100 ng/mL), Glucantime® (16 mg/mL) e CXCL10+Glucantime® (25, 50 e 100 ng/mL) + (16 mg/mL). Após 24 horas e 48 horas de infecção, avaliou-se a carga parasitária nos macrófagos infectados e a produção de óxido nítrico (NO) e das citocinas IL-12, TNF- α , IL-4 e IL-10 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos. Observou-se que tanto CXCL10 como a associação CXCL10+Glucantime®, nas três concentrações utilizadas, revelaram importante redução da carga parasitária nos macrófagos infectados, com diminuição maior na concentração de 100ng/mL, 74% e 75%, respectivamente, sendo essa redução maior do que aquela induzida por Glucantime® (50%). Quando as células foram tratadas com CXCL10 sozinho, a redução do número de parasitos intracelulares estava correlacionada com o aumento de NO, entretanto, ao contrário, na associação com Glucantime®, mesmo com redução da carga parasitária, observou-se diminuição na produção de NO a medida que a concentração de CXCL10 foi aumentada. Em relação as citocinas, observou-se que CXCL10 e a associação com Glucantime® induziram maiores concentrações de IL-12 e TNF- α , e menores de IL-10 e de IL-4, quando comparado com Glucantime®, sugerindo a indução de um importante perfil Th1. Coletivamente, os dados deste trabalho sugerem um papel imunoprotetor de CXCL10, associado ou não a Glucantime®, em macrófagos RAW 264.7 infectados por *L. infantum*. Os dados desse estudo podem ainda fornecer informações para o desenvolvimento de futuras intervenções terapêuticas para a leishmaniose visceral, utilizando CXCL10 como adjuvante ao Glucantime®.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, CXCL10, Macrófagos RAW 264.7, Citocinas, Óxido nítrico.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is the gravest form of leishmaniasis caused by the genus *Leishmania*, and is characterized by the loss of the host's ability to generate an effective immune response. Chemokines have direct involvement in the pathogenesis of leishmaniasis, and may potentially be used as adjuvants in the treatment of such diseases. CXCL10 is a chemokine that has shown promising results in the treatment of leishmaniasis. The objective of this study was to verify the in vitro effect of the association of CXCL10 with Glucantime® on RAW 264.7 macrophages infected by *L. infantum*. RAW 264.7 macrophages were infected with *L. infantum* in vitro and treated or not with CXCL10 (25, 50 and 100 ng/ mL), Glucantime® (16 mg/mL) and CXCL10+Glucantime® (25, 50 and 100 ng/mL) + (16 mg/mL). Parasite load in infected macrophages, as well as nitric oxide (NO), IL-12, TNF- α , IL-4 and IL-10 production in the supernatants of macrophages were assessed at 24h and 48h after infection. It was observed that both CXCL10 and CXCL10 + Glucantime®, in the three concentrations used, showed a significant reduction of the parasite load in the infected macrophages, with a decrease in the concentration of 100ng/mL, 74% and 75%, respectively, and this reduction was greater than that induced by Glucantime® (50%). When the cells were treated with CXCL10 alone, the reduction in the number of intracellular parasites was correlated with the increase in NO, however, in contrast, in the association with Glucantime®, even with reduction of the parasitic load, there was a decrease in NO production, as the concentration of CXCL10 was increased. Regarding the cytokines, it was observed that CXCL10 and the association with Glucantime® induced higher concentrations of IL-12 and TNF- α , and lower IL-10 and IL-4, when compared to Glucantime®, suggesting the induction of a important profile Th1. Collectively, data from this work suggest an immunoprotective role of CXCL10, associated or not to Glucantime®, in RAW 264.7 macrophages infected by *L. infantum*. Data from this study may also provide information for the development of future therapeutic interventions for visceral leishmaniasis, using CXCL10 as adjuvant with Glucantime®.

Key words: *Leishmania infantum*, CXCL10, RAW 264.7 macrophages, Cytokines, Nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Leishmaniose visceral no mundo.....	12
Figura 2 – Casos e óbitos de Leishmaniose visceral no Ceará entre 2016 e 2017	13
Figura 3 – Ciclo de vida de <i>Leishmania infantum</i>	14
Figura 4 – Desenho experimental.....	26

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Carga parasitária em macrófagos RAW 264.7 infectados com <i>Leishmania infantum</i> e tratados com CXCL10	30
Gráfico 2 – Carga parasitária em macrófagos RAW 264.7 infectados com <i>Leishmania infantum</i> e tratados com a associação de CXCL10+ Glucantime®	31
Gráfico 3 – Produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 infectados com <i>Leishmania infantum</i> e tratados com CXCL10	32
Gráfico 4 – Produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 infectados com <i>Leishmania infantum</i> e tratados com a associação de CXCL10+Glucantime®....	33
Gráfico 5 – Produção de IL-12, TNF- α , IL-4 e IL-10 por macrófagos RAW 264.7 infectados com <i>Leishmania infantum</i> e tratados com CXCL10 associado ou não a Glucantime®.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Célula apresentadora de antígenos
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LV	Leishmaniose Visceral
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
N.N.N	McNeal, Novy, Nicolle
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Nitrito
PBS	Solução-tampão fosfato
PMN	Polimorfonuclear
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SBF	Soro bovino fetal
Th	T helper
TNF	Fator de necrose tumoral
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Leishmaniose visceral: agente etiológico e vetor.....	11
1.2	Epidemiologia.....	11
1.3	Ciclo de <i>Leishmania infantum</i>	14
1.4	Aspectos clínicos e patológicos da Leishmaniose visceral (LV).....	15
1.5	Aspectos imunológicos da Leishmaniose visceral	16
1.6	Quimiocinas e seus receptores	18
1.7	CXCL10 na infecção por <i>Leishmania</i> spp.	19
1.8	Tratamento	21
2	JUSTIFICATIVA	24
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo geral.....	25
3.2	Objetivos específicos.....	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	Desenho experimental	26
4.2	Reagentes e meios de cultura	26
4.3	Parasito	27
4.4	Isolamento, cultura, infecção e tratamento de macrófagos	27
4.5	Determinação da taxa de infecção dos macrófagos	28
4.6	Dosagem de citocinas	28
4.7	Dosagem de óxido nítrico (NO)	29
4.8	Análise estatística.....	29
5	RESULTADOS	30
5.1	Avaliação da infecção de macrófagos por <i>Leishmania infantum</i> in vitro tratados com CXCL10 associado ou não a Glucantime®	30
5.2	Produção de óxido nítrico por macrófagos infectados por <i>Leishmania infantum</i> in vitro tratados com CXCL10 associado ou não a Glucantime®	32
5.3	Produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias em sobrenadante de macrófagos infectados com <i>L. infantum</i> e tratados com CXCL10 associado ou não a Glucantime®	34
6	DISCUSSÃO	36

7	CONCLUSÃO.....	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose visceral: agente etiológico e vetor

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e são transmitidas através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectados (BRASIL, 2016; PAHO/WHO, 2017).

As leishmanias são patógenos intracelulares obrigatórios que se replicam preferencialmente em macrófagos ou monócitos (RODRIGUES *et al.*, 2016). O ciclo de vida deste parasito é heteroxeno, apresentando duas formas evolutivas principais: forma extracelular, promastigota, encontrada no trato digestivo dos vetores flebotomíneos; e forma amastigota, intracelular, encontrada parasitando células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) dos hospedeiros mamíferos (CHAPPUIS *et al.*, 2007; NEVES *et al.*, 2016). O complexo *Leishmania donovani* reúne as duas espécies responsáveis pela Leishmaniose visceral (LV) no mundo: *L. (Leishmania) donovani* e *L. (L.) infantum* (PISCOPO; MALLIA, 2006; NEVES *et al.*, 2016).

Anteriormente, *L. chagasi* era aceita como a espécie causadora de LV no continente americano, mas atualmente alguns autores a consideram como sinonímia de *L. infantum* e não fazem distinção entre as subespécies *L. chagasi*, agente etiológico nas Américas e *L. infantum*, presente no Velho Mundo (MAURICIO *et al.*, 2000).

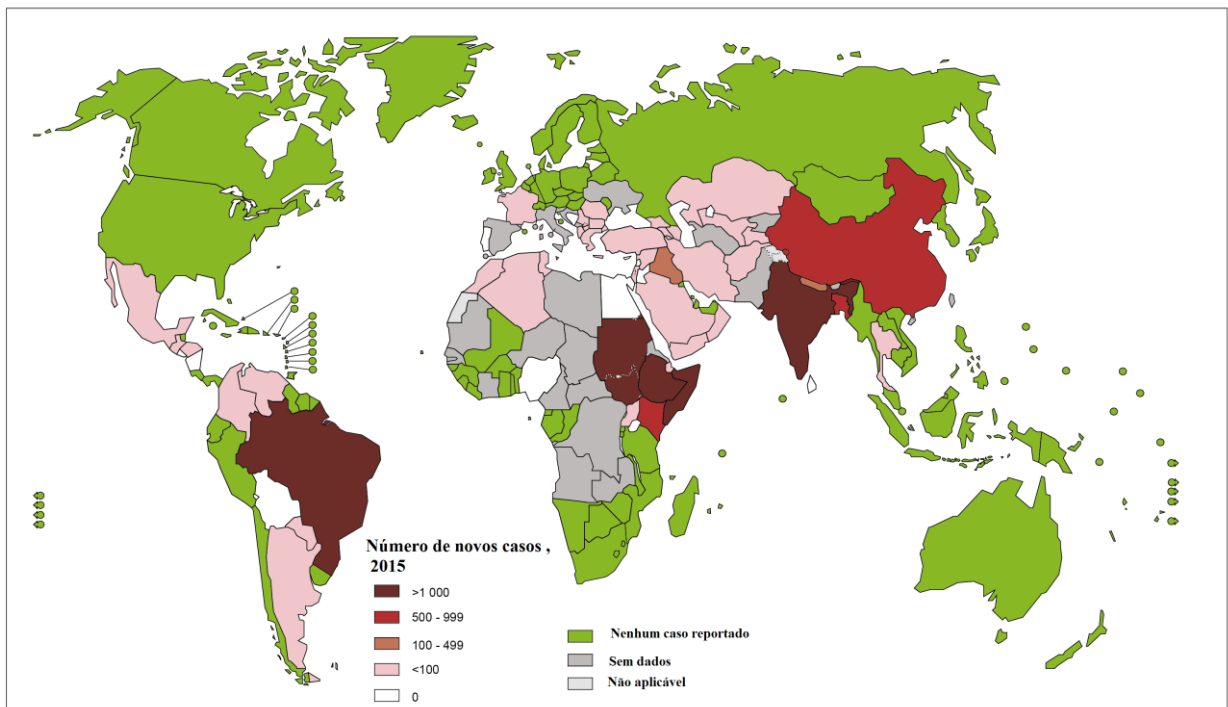
No Brasil, existem 2 espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* que estão relacionadas com a transmissão da LV, *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi*. A espécie *Lu. longipalpis* é encontrada nas cinco regiões do Brasil e é considerada a principal transmissora da forma visceral no país, enquanto *Lu. cruzi* encontra-se restrita ao Estado do Mato Grosso (ANDRADE-FILHO *et al.*, 2017).

1.2 Epidemiologia

As leishmanioses são uma das mais prevalentes doenças tropicais negligenciadas que afetam a Saúde Pública do mundo inteiro (HOTEZ *et al.*, 2007). Estima-se que pelo menos 20 milhões de pessoas estejam infectadas por *Leishmania*. Anualmente, ocorrem aproximadamente 500 mil novos casos de LV no mundo e mais de 90% desses casos são registrados no Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão (HOTEZ, 2010).

Nas Américas, a LV é dividida em 3 grupos: países com expansão da transmissão (Argentina, Brasil e Paraguai), países com transmissão estável ou controlada (Colômbia e Venezuela) e países com transmissão esporádica (Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Bolívia, Guiana e México) (PAHO/WHO, 2017). Nas Américas, os casos de LV estão presentes em 12 países; no entanto, 96% dos casos são relatados no Brasil (PAHO/WHO, 2017). (Figura 1)

Figura 1 – Leishmaniose visceral no mundo

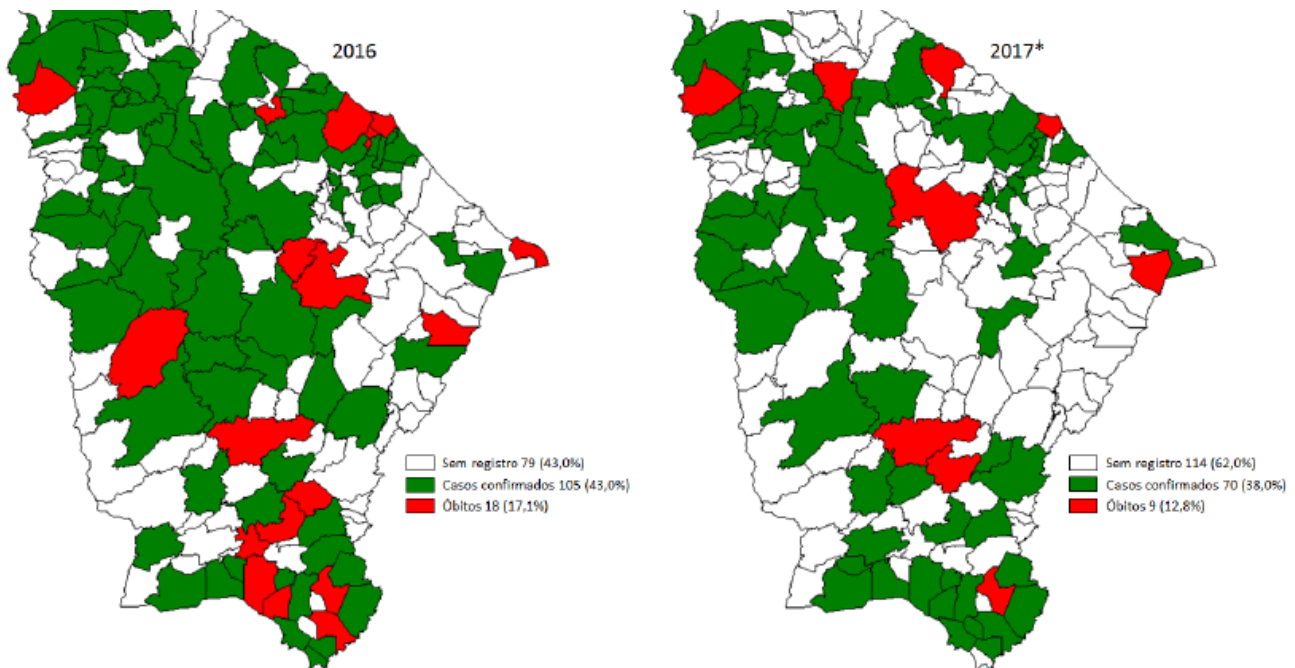


Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2017.

De 2001 a 2015, foram relatados 52.176 casos nas Américas. De 2004 a 2011 houve uma tendência de constância no número de casos, com uma média anual de 3.835 registros, no entanto, em 2012, os casos apresentaram-se reduzidos para 2.892. O número voltou a aumentar a partir de 2013, com 3.492 casos (PAHO/WHO, 2017). Contudo, entre 2001 e 2011, levando-se em conta as subnotificações, a média de casos nas Américas foi de 4.500 a 6.800 casos/ano (ALVAR *et al.*, 2012).

No Ceará, em 2017, até a Semana Epidemiológica 34, foram notificados 499 casos, com 191 confirmados, 219 descartados, 51 inconclusivos e 38 ignorados ou em branco, apresentando uma incidência de 2,1 por 100 mil habitantes (BRASIL, 2017) (Figura 2).

Figura 2 – Casos e óbitos de Leishmaniose visceral no Ceará entre 2016 e 2017



Fonte: Boletim epidemiológico Secretaria da Saúde, 2017.

No Ceará, entre 2008 e 2017 (outubro), 95,0% (175/184) dos municípios confirmaram casos de LV, foram notificados 9.247 casos e destes, 5.312 (57,4%) foram confirmados. Os municípios com maior ocorrência foram Fortaleza com 32,4% (1.984/6.116), seguido de Sobral com 5,69% (348/6.116), Caucaia com 5,3% (329/6.116), Maracanaú com 3,6% (220/6.116), Juazeiro do Norte 2,96% (181/6.116) e Barbalha 2,2% (135/6.116). Durante esse período ocorreram 342 mortes pela doença no Estado, distribuídas em 80 (43,5%) municípios (BRASIL, 2017).

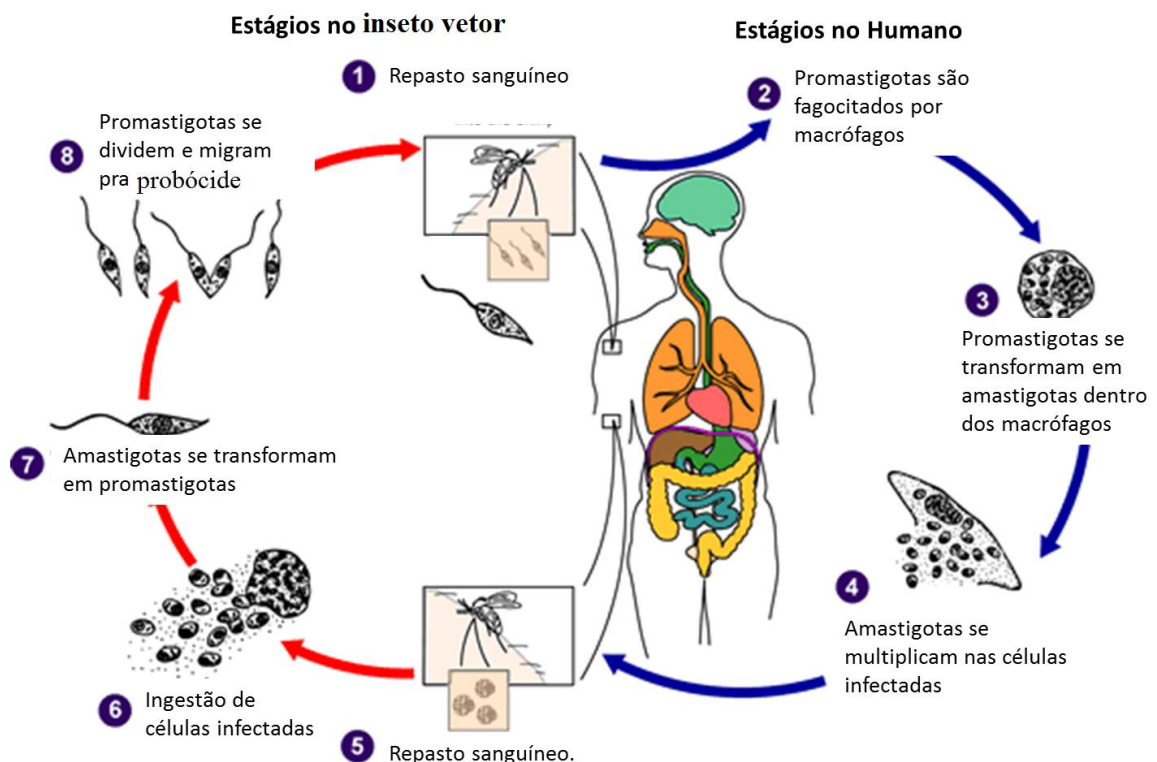
Durante décadas tem ocorrido a migração da zona rural para a zona urbana, com construção de casa em locais que são habitat naturais do vetor, ocorrendo a domesticação do vetor (DESJEUX, 2001; BORGES *et al.*, 2009). Em 2009, estudos mostraram que a doença vinha se instalando rapidamente na área urbana de Fortaleza (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009). A urbanização da LV, juntamente com as condições precárias de vida foram observadas também em outras capitais do Nordeste, como São Luís, Teresina, Natal e Salvador (COSTA, 2008).

1.3 Ciclo de *Leishmania infantum*

A principal via de transmissão, nas condições naturais, é através da picada da fêmea de *Lu. longipalpis*, durante o repasto sanguíneo nos reservatórios animais. A fêmea infectada, ao se alimentar de sangue, inocula as formas promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro, homem ou animal, juntamente com sua saliva, rica em substâncias com grande potencial inflamatório e vasodilatador, o que contribui para o aumento de células fagocitárias neste local. No organismo do hospedeiro vertebrado, essas formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos, os parasitos fagocitados permanecem dentro do fagolisossomo, onde se transformam em amastigotas e se multiplicam por divisão binária (BATES, 2007; NEVES *et al.*, 2016). (Figura 3)

Essa multiplicação parasitária acarreta o rompimento da membrana celular dos macrófagos e a liberação das amastigotas que infectam novas células. Assim, os parasitos com tropismo viscerotrópico disseminam-se para os órgãos alvo: medula óssea, fígado e baço. Estas 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 (Figura 3) (NEVES *et al.*, 2016).

Figura 3 – Ciclo de vida de *Leishmania infantum*



Fonte: Adaptada do Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

No flebotomíneo, após a ingestão das amastigotas, as células fagocíticas se rompem na porção média do tubo digestivo, liberando as amastigotas, que irão se transformar em promastigotas procíclicas. Estas formas sofrem maturação, se transformando em promastigotas metacíclicas, fenômeno chamado metaciclogênese, se multiplicam por divisão binária e migram para a porção anterior do tubo digestivo do vetor, permanecendo ali 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 (BATES, 2007; NEVES *et al.*, 2016). (Figure 3)

1.4 Aspectos clínicos e patológicos da Leishmaniose visceral (LV)

A LV é uma das formas clínicas considerada mais graves das manifestações das leishmanioses, devido às complicações e potencial de progressão para a morte se não for tratada (PISCOPO; MALLIA, 2006). O curso clínico da doença depende de vários fatores relacionados com a natureza da resposta imunológica, da genética, estado nutricional e idade do hospedeiro. A espécie de *Leishmania* e a quantidade de parasitos inoculados também são fatores importantes, por conta da infectividade e patogenicidade do parasito (BADARO *et al.*, 1986; PEARSON; SOUZA, 1996; MURRAY *et al.*, 2005).

O tempo de incubação do protozoário pode variar de 3 a 8 meses, como pode durar apenas 10 dias em alguns casos, ou ainda se estender por um período muito longo, de 34 meses em outros casos (PEARSON; SOUZA, 1996). Os sintomas aparecem de forma gradativa, podendo também se manifestar rapidamente, e neste caso, levar a um desfecho fatal em poucas semanas. Os sintomas clássicos são febre irregular e mal-estar, perda de peso progressiva, hepatoesplenomegalia, anemia, pancitopenia e caquexia, podendo levar à morte dentro de 2 a 3 anos, se não houver tratamento (STANLEY, 2007; FERREIRA *et al.*, 2008).

As manifestações clínicas da doença podem variar de uma infecção assintomática a uma doença visceral progressiva, podendo ser divididas em três períodos: período inicial, período de estado e período final (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005; BRASIL/MS, 2006).

O período inicial, também chamado de fase aguda, representa o início da sintomatologia, que na maioria das vezes corresponde a sintomas como hepatoesplenomegalia e febre com duração de no máximo quatro semanas (BRASIL/MS, 2006). No período de estado o infectado tem febre irregular, geralmente associada a emagrecimento progressivo,

palidez cutânea mucosa e hepatoesplenomegalia (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005). No período final, o paciente apresenta febre contínua e o seu estado geral piora, ocorrendo edema nos membros inferiores. Outras manifestações importantes incluem hemorragias, icterícia e ascite. Indivíduos não tratados ficam imunossuprimidos, e, portanto, susceptíveis a infecções bacterianas oportunistas (KAYE *et al.*, 2004; PISCOPO; MALLIA, 2006). O óbito geralmente é determinado por infecções bacterianas e/ou hemorragias (COSTA *et al.*, 2016).

A suspeita diagnóstica da LV deve ser baseada em dados epidemiológicos e nos achados clínicos e laboratoriais, mas o diagnóstico é confirmado através da existência do parasito em tecido infectado (PASTORINO *et al.*, 2002). Os exames sorológicos, como a imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), possuem alta sensibilidade, mas uma especificidade não muito boa, uma vez que podem apresentar reações cruzadas com antígenos de outros organismos, como *Trypanosoma*, *Mycobacterium*, *Plasmodium* e *Schistosoma* (KARP *et al.*, 1993; PASTORINO *et al.*, 2002).

A pesquisa de antígenos de *Leishmania* pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) apresenta alta sensibilidade e especificidade, uma vez que é sensível o suficiente para detectar um número muito baixo de parasitos nas amostras (ORDEIX *et al.*, 2005). Entretanto, em indivíduos provenientes de áreas endêmicas, com alta exposição antigênica, um resultado positivo no ensaio de PCR deve ser considerado com cautela, uma vez que pode significar exposição prévia ao parasito e não necessariamente doença (RAVEL *et al.*, 1995).

1.5 Aspectos imunológicos da Leishmaniose visceral

A LV humana tem como característica a modulação da resposta imunológica celular ao antígeno de *Leishmania* (BACELLAR *et al.*, 2002). O parasito tem tropismo por alguns órgãos específicos, tais como a medula óssea, o fígado e o baço (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005; LANG; LECOEUR; PRINA, 2009). A doença tem um curso diferente dependendo do órgão: no baço, a doença é caracterizada pela persistência do parasito, chegando a atingir um estágio crônico se não tratada, enquanto no fígado, a infecção pode ser controlada ainda no início, com posterior desenvolvimento da imunidade em reinfecções (ENGWERDA; KAYE, 2000; STANLEY; ENGWERDA, 2007).

No hospedeiro vertebrado, a capacidade de induzir a resposta imunológica mediada por célula é a principal defesa contra as leishmanioses. As células dendríticas são capazes de produzir interleucina 12 (IL-12), ativando células T CD4 antígeno-específicas (SOONG,

2008; VON STEBUT, 2007). IL-12 é uma das citocinas mais importantes da fase inicial da infecção por *Leishmania*. Essa citocina é produzida primariamente por células apresentadoras de antígeno (APCs) como monócitos, macrófagos, células dendríticas e células B, possuem efeito sobre células T e células “*natural killer*” (NK), nas quais IL-12 tem papel de estimular a produção de IFN- γ , além de proliferação celular e citotoxicidade (MULLER *et al.*, 2001; ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004; DIAZ; ZERPA; TAPIA, 2013). A proliferação de linfócitos e produção de altos níveis de interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) levam ao controle da infecção (GOMES-SILVA *et al.*, 2007; SCHNORR *et al.*, 2012).

Durante a infecção, os macrófagos também são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias no local, contribuindo para a produção de TNF- α , e isto pode ativar as células apresentadoras de antígeno para assim aumentar a capacidade das células T CD4+ para produzirem IFN- γ (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Pacientes com LV apresentam altos níveis séricos de TNF- α e IL-6 (CENINI *et al.*, 1993), que diminuem após a terapêutica com antimonial. Essas citocinas estão relacionadas com febre e astenia e TNF- α pode contribuir também para a perda de peso e acentuar a desnutrição nesses pacientes (GHALIB *et al.*, 1993).

A imunidade para *Leishmania* depende do desenvolvimento de resposta imunológica com perfil dos Linfócitos T helper tipo 1 (Th1), caracterizada pela produção inicial de IL-12 e IFN- γ por APCs que induzem a secreção de IFN- γ , que é outro mediador inflamatório muito importante na resposta imunológica à *Leishmania*. IFN- γ , por sua vez, induzirá a ativação dos mecanismos microbicidas dos macrófagos que ativa a enzima óxido nítrico sintase (iNOS), levando ao estímulo da ação microbicida mediada por Óxido Nítrico (NO) (RODRIGUES *et al.*, 2016).

A produção de NO como uma via efetora comum de defesa do macrófago contra *Leishmania* tem sido bem documentada. Os níveis de NO produzidos por macrófagos ativados por IFN- γ ou por TNF- α estão relacionados com resistência à infecção (LIU; UZONNA, 2012). A atividade leishmanicida do macrófago está também na dependência da produção de TGF- β . Essa citocina está relacionada com a desativação de macrófago, inibição da ação de IFN- γ e redução da expressão de moléculas que formam o complexo principal de histocompatibilidade II (MHC classe II) (FILARDY; PIRES; DOSREIS, 2011; LIU; UZONNA, 2012).

As citocinas IL-4 e IL-10 são outros mediadores que têm papel importante na

leishmaniose. IL-4 é sintetizada por Linfócitos T helper tipo 2 (Th2), tem função de induzir a proliferação e diferenciação de células B, aumenta a expressão de MHC classe II, possibilitando maior ativação de células Th2 (VARELLA; FORTE, 2001). Na LV humana, a ativação de células Th2 pode estar envolvida na progressão da doença. Foram demonstrados níveis altos de IL-4 no soro de pacientes com LV, assim como também IgE e IgG1 (ZWINGENBERGER *et al.*, 1990; ATTA *et al.*, 1998).

IL-10 é produzida por monócitos, células fagocíticas mononucleares e células dendríticas (BORISH; STEINKE, 2006) e contribui para a sobrevivência do parasito. Outro efeito importante de IL-10 nos macrófagos é a inibição dos eventos metabólicos associados com sua ativação (BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 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. IL-10 atua ainda como um co-estimulador para a proliferação de mastócitos e seus progenitores (VARELLA; FORTE, 2001). A atividade imunossupressora da citocina pode promover a replicação do parasito e evolução da doença (NYLÉN; SACKS, 2007).

Sabe-se que IL-4 e IL-10 possuem efeito anti-inflamatório, contrabalanceando o efeito inflamatório de IFN- γ e TNF- α na infecção por *Leishmania*. Porém, os níveis destas citocinas são dependentes da forma clínica da doença (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; GOMES-SILVA *et al.*, 2007).

1.6 Quimiocinas e seus receptores

As quimiocinas são pequenas proteínas quimiotáticas (8 a 17 kDa) (ROSSI; ZLOTNIK, 2000; ROT; VON ANDRIAN, 2004; ABREU *et al.*, 2017). São citocinas que têm o papel de recrutar leucócitos nas respostas imunológicas inatas e adaptativas (MOSER; WILLIMANN, 2004). As quimiocinas têm demonstrado desempenhar um papel crucial na determinação da evolução da leishmaniose e na determinação da imunidade em várias outras doenças (JONES *et al.*, 2003; RODRIGUEZ-SOSA *et al.*, 2003; MOSER; WILLIMANN, 2004).

As quimiocinas são classificadas em famílias com base no número e na localização dos resíduos de cisteína amino-terminais. As duas maiores famílias de quimiocinas são as CXC e as CC (RITTER; KORNER, 2002). Enquanto as quimiocinas CXC têm as suas duas primeiras cisteínas separadas por um aminoácido, as quimiocinas CC têm as suas duas primeiras cisteínas unidas (OGHUMU *et al.*, 2010).

Membros da classe CXC agem principalmente em células polimorfonucleares (PMNs), enquanto membros da classe CC agem em um grupo maior de células, incluindo monócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos, mas não em PMNs (RITTER; KORNER, 2002).

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; MARTI, 2015). Atuam, ainda, como mediadores cruciais na polarização de células Th1 e na ativação e tráfego de células envolvidas nas respostas inflamatórias (CHARO; RANSOHOFF 2006).

As quimiocinas medeiam as suas ações através da ligação com receptores de quimiocinas (VIOLA; LUSTER, 2008). Esses receptores pertencem à superfamília dos receptores de sinalização intracelular acoplado à proteína G (MURDOCH; FINN, 2000). Aproximadamente 50 quimiocinas humanas foram descritas e 21 tipos de receptores de quimiocinas foram identificados (TEIXEIRA *et al.*, 2006; OGHUMU *et al.*, 2010). Receptores estes que estão classificados estruturalmente em quatro classes: CXCR, CCR, XCR e CX3CR (ABREU *et al.*, 2017; MORENO *et al.*, 2014).

Devido a seu importante papel quimiotático e na mediação de processos inflamatórios, várias quimiocinas vêm sendo estudadas como agentes terapêuticos em infecções ou doenças em que o sistema imunológico necessita de estímulo, como no caso das leishmanioses (OGHUMU *et al.*, 2010). Além da atividade quimiotática, há crescente valorização da capacidade dessas moléculas de mediar a modulação de respostas de citocinas, como já foi mostrado em alguns estudos, nos quais CXCL10 mostrou-se eficiente na indução de células imunológicas durante a infecção por *L. donovani*, ou em lesões cutâneas, onde apresentou significativo papel na diminuição da carga parasitária (VASQUEZ; SOONG, 2006; FALLAHI; ELIA; BONATTI, 2016).

1.7 CXCL10 na infecção por *Leishmania* spp.

Trabalhos publicados sugerem que quimiocinas, como CCL2, CCL3, CXCL8 e CXCL10, desempenham importantes papéis na infecção por *Leishmania*, incluindo funções de defesa do hospedeiro, tais como recrutamento de leucócitos, ativação celular, participação na imunidade mediada por células e atividade leishmanicida, indicando que essas proteínas podem ser relevantes para o controle e/ou progressão da doença (TEIXEIRA *et al.*, 2006; OGHUMU *et al.*, 2010).

A quimiocina CXCL10 pertence a uma subpopulação de citocinas que são

mediadores cruciais para a função de leucócitos, recrutamento de monócitos, macrófagos, polarização de células Th1, ativação e tráfego de células envolvidas nas respostas inflamatórias (CHARO; RANSOHOFF, 2006; VASQUEZ; SOONG, 2006). CXCL10, anteriormente chamada de IP-10 (proteína induzível por IFN- γ), é uma molécula pequena (10 kDa), secretada principalmente por monócitos, neutrófilos, queratinócitos, células dendríticas, células mesenquimais, fibroblastos e células endoteliais em resposta a estímulos como uma infecção viral, lipopolissacarídeos (LPS) e IL-1, entre outros (LEE; LEE; SONG, 2009; GUPTA *et al.*, 2009).

Várias funções têm sido atribuídas à 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, inibição da formação de colônias na medula óssea e angiogênese (DUFOUR *et al.*, 2002). CXCL10 induz os seus efeitos através da ligação à superfície celular do receptor de quimiocina CXCR3 (BOOTH *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2004), conhecido por estar expresso em vários tipos de células, tais como células T CD4+ e CD8+ ativadas e de memória, células NK, algumas populações de células dendríticas, células endoteliais, macrófagos e células B (VESTER *et al.*, 1999; RITTER; MOLL, 2000; COLVIN *et al.*, 2004; MOHAN *et al.*, 2005).

Na LV, algumas quimiocinas e receptores de quimiocinas têm um papel relevante no desenvolvimento da resposta Th1, pois a supressão destas quimiocinas influencia nos níveis de IFN- γ produzidos por células T. As quimiocinas também estão implicadas na amplificação da resposta inflamatória por célula T, importante para a resposta protetora do hospedeiro na LV (COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 1999).

Camundongos BALB/c submetidos à infecção por *L. donovani* sofrem uma acumulação hepática rápida de CCL2, CCL3 e CXCL10 após a infecção (COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 1999). 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 atraídas por CCL2 e CCL3, seguindo por estimulação de IFN- γ , poderiam ser a fonte de quimiocinas mobilizadas por Th1, tais como CXCL10 (FARBER, 1997).

Ao contrário das células do fígado, células do baço de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* produzem citocinas, tanto do tipo Th1 como Th2, 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). Embora esse não seja o único mecanismo, mas explica,

em parte, porque o fígado normalmente controla a infecção, enquanto que no baço os parasitos persistem (KAYE *et al.*, 1994).

CXCL10 tem sido relatada como uma quimiocina atuante na resposta protetora contra *L. donovani*, induzindo uma resposta celular tipo Th1, por meio da regulação da via de mediadores inflamatórios, como NO e citocinas proinflamatórias (GUPTA *et al.*, 2011). Alguns trabalhos mostraram que a injeção de CXCL10 em camundongos BALB/c infectados com *L. major* promove um forte recrutamento e ativação de células NK (VESTER *et al.*, 1999; MULLER *et al.*, 2001). Outro estudo em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e tratados com CXCL10 demonstrou que o tamanho da lesão e a carga parasitária diminuem, e isso foi mediado por IFN- γ , IL-12 e NO (VASQUEZ; SOONG, 2006).

1.8 Tratamento

Os medicamentos de primeira escolha disponíveis para o tratamento das leishmanioses (visceral e tegumentar) são os antimoniais pentavalentes - estibogluconato de sódio (Pentostam®), comercializados nos Estados Unidos e Europa; e antimoniato de meglumina (Glucantime®), utilizado na América Latina e África. Esses fármacos vêm sendo utilizados como tratamento contra as leishmanioses desde 1940 (AMATO *et al.*, 2008; 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). Esses medicamentos provocam regressão rápida das manifestações clínicas e hematológicas da doença, mas não provocam a morte do parasito (BERMAN; WYLER, 1980).

Os antimoniais apresentam, contudo, várias inconveniências que incluem dor no local da injeção, artralgia e mialgias, toxicidade cardíaca, e em alguns casos, insuficiências hepática e renal. Efeitos colaterais como nefrites, distúrbios gastrintestinais, cardiovasculares e respiratórios têm sido observados (ROBERTS; MCMURRAY; RAINEY, 1998; AMATO *et al.*, 2008). Estes fármacos requerem tratamento prolongado e apresentam custo elevado (RATH *et al.*, 2003). Verifica-se, com frequência, o abandono do tratamento, ou uso de subdosagem, o que tem acarretado o surgimento de cepas resistentes ao tratamento com antimoniais, sendo atualmente um dos maiores problemas do tratamento com os antimoniais (BLUM *et al.*, 2004; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Glucantime® tem sido eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral, mas nos últimos anos, devido às baixas dosagens e tratamentos descontínuos, começaram a ocorrer falhas na terapia e consequente aumento de formas resistentes do parasito ao antimônio, este último sendo um dos maiores problemas atuais (BALANA-FOUCE *et al.*, 1998; TORRES *et al.*, 2013).

A OMS preconiza que as doses de antimoniais não devem ultrapassar 20 mg/kg/dia e nem o limite de 850 mg/dia de antimônio, devido à sua elevada toxicidade. Após administração endovenosa ou intramuscular, Glucantime® é rapidamente absorvido e, praticamente, 90% do antimônio é excretado nas primeiras 48 horas 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 (ROBERTS; MCMURRAY; RAINEY, 1998).

As referências científicas citadas no Manual de Normas e Condutas do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006) mostram que existem comorbidades que contraindicam o uso de Glucantime®, tais como cardiopatias, doença renal ou hepática. Nesses casos, o fármaco de primeira escolha deverá ser outro. 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.*, 1987).

Outras alternativas de tratamento que foram estudadas e testadas são os imunomoduladores, como as citocinas IFN- γ , GM-CSF e IL-12. Em um estudo feito com pacientes infectados com leishmaniose visceral, IFN- γ apresentou o efeito de aumentar a morte das leishmanias, resposta que é mediada pela ativação de células T que desencadeia a produção de IFN- γ , aumentando a capacidade do macrófago de eliminar patógenos intracelulares (BADARO *et al.*, 1990). A terapia combinada de IFN- γ e o antimônio pentavalente apresentou taxas mais fortes de cura parasitológica e clínica em pacientes com

LV (principalmente crianças) do Brasil, Quênia e Índia, em comparação com o fármaco sozinho, mas, infelizmente, esses estudos apresentaram várias limitações, entre os efeitos colaterais da citocina (SUNDAR *et al.*, 1997; ADRIAENSEN, 2017).

Em relação ao GM-CSF, a justificativa para explorar esta citocina como agente imunoterapêutico deriva de efeitos documentados, como a mobilização de monócitos, a ativação de macrófagos, a produção de citocinas próinflamatórias e a melhora da neutropenia (MURREY *et al.*, 1995; ADRIAENSEN, 2017). GM-CSF foi testado como imunoterapia para tratar pacientes com leishmaniose mucocutânea (LMC) com histórico de falha por antimônio e mostrou-se bastante seguro e promissor para tratar LMC refratária ao antimônio (BADARÓ *et al.*, 2006).

Outros estudos mostram também a eficácia terapêutica de IL-12 como tratamento quando administrado no início ou próximo do início da infecção causada por *L. major*, *Toxoplasma gondii* ou *Cryptococcus neoformans*. O tratamento com IL-12 induz uma atividade antimicrobiana protetora (MURRAY; HARIPRASHAD, 1995; ADRIAENSEN, 2017).

Os recentes relatos de resistência ao antimônio em pacientes com leishmaniose em várias partes do mundo têm comprometido fortemente a habilidade de controlar a doença (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Além disso, a resistência aos antimoniais pode significar uma situação alarmante frente ao aumento dos casos de coinfeção 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 e justificáveis.

2 JUSTIFICATIVA

Dentre as doenças negligenciadas, com alta taxa de incidência e mortalidade, destaca-se a leishmaniose como grave problema de saúde pública, no Brasil e em outros países em desenvolvimento. Estima-se que em torno de 1,5 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea e 500 mil de leishmaniose visceral surgem a cada ano.

Entre os mais utilizados fármacos disponíveis para tratar a leishmaniose visceral, estão os antimoniais pentavalentes (Glucantime® e Pentostam®). Entretanto, apesar de apresentarem eficácia na maioria dos casos, possuem várias inconveniências, como a via de administração (intramuscular ou endovenosa), a ocorrência de falha terapêutica, tratamento prolongado (mais de 30 dias), efeitos colaterais graves (incluindo toxicidades cardíaca, hepática e renal) e o aparecimento de cepas de *Leishmania* resistentes ao tratamento, o que é um dos maiores problemas na atualidade para o tratamento das leishmanioses.

A administração de citocinas como adjuvante no tratamento das leishmanioses já tem sido relatada na literatura, e mais recentemente, a administração de quimiocinas tem mostrado resultados promissores em modelos experimentais de leishmaniose, tanto na forma tegumentar, como na visceral. A proposta deste trabalho é verificar o efeito *in vitro* da associação da quimiocina CXCL10 com Glucantime®, na infecção de macrófagos RAW 264.7 por cepa de *L. infantum*, baseia-se no conhecimento de que esta quimiocina favorece 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, podendo, portanto, auxiliar de forma mais eficaz na resposta terapêutica do antimonial.

Diante do exposto e considerando a fisiopatologia da leishmaniose visceral, onde, dentre outros aspectos, a inflamação e o sistema imunológico possuem um papel fundamental, percebe-se a importância de se investir em novas abordagens. A abordagem deste trabalho pode fornecer, portanto, novas informações para o desenvolvimento de futuras intervenções terapêuticas na leishmaniose visceral, utilizando CXCL10 como adjuvante, associado ou não aos antimoniais pentavalentes, contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento científico e estudos em uma área de grande importância para a saúde pública.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar o efeito do tratamento com a quimiocina CXCL10 isolada ou associada ao Glucantime® em macrófagos RAW 264.7 infectados com *Leishmania infantum*.

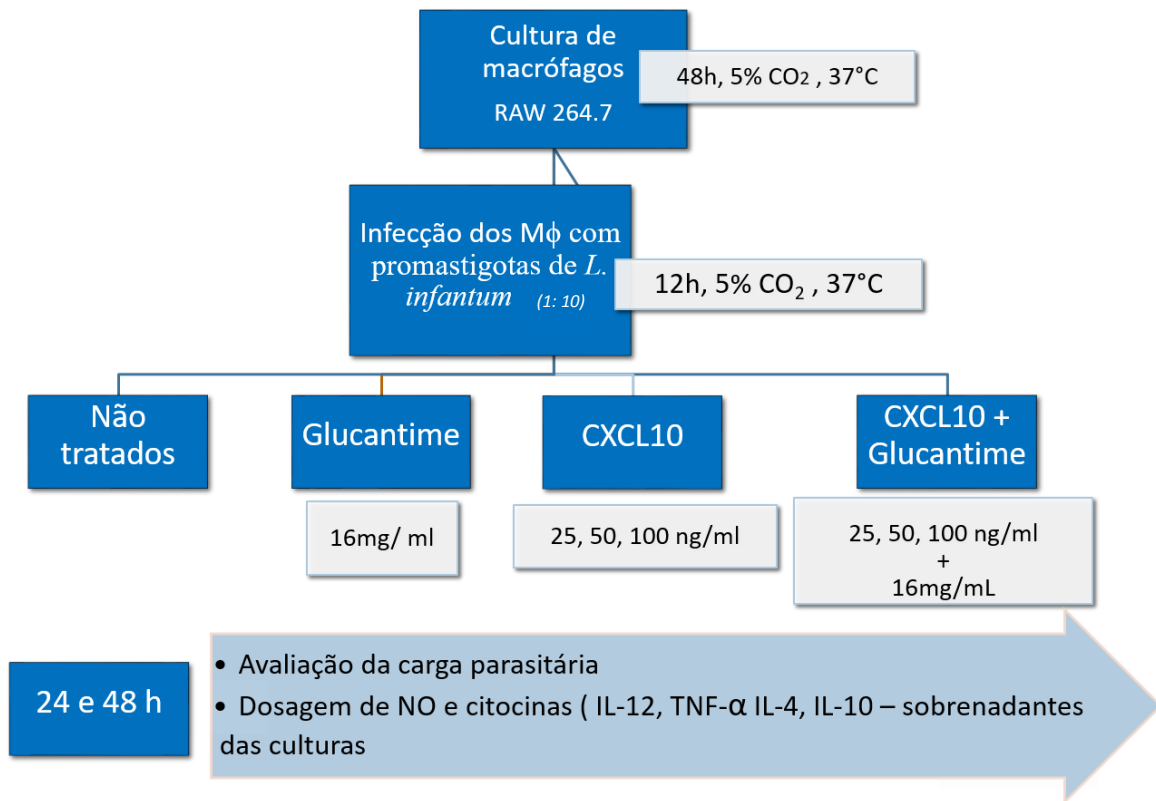
3.2 Objetivos específicos

1. Determinar a carga parasitária em macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. infantum*;
2. Avaliar a concentração de óxido nítrico e das citocinas IL-12, TNF- α , IL-4 e IL-10, no sobrenadante de cultura de macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. infantum*;
3. Comparar o efeito do tratamento com CXCL10 isolado ou associado com Glucantime®, em macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. infantum*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho experimental

Figura 4 – Desenho experimental



Fonte: Elaborado pelo autor.

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. Alíquotas de 10 µg/mL foram conservadas a -20°C até o uso. Para os experimentos, alíquotas de 10 µg/mL foram diluídas com RPMI para as concentrações de 25, 50 e 100 ng/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 (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina; Sigma-Aldrich). É mencionado, neste trabalho 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 μ M de 2-mercaptoetanol, 2 mM L-glutamina (Gibco), e antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina). É mencionado neste trabalho 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 μ g/mL de estreptomicina).

4.3 Parasito

A cepa de *L. infantum* (Ba-262) foi isolada na Bahia, de paciente com leishmaniose visceral, e gentilmente cedida pela Dra. Aldina Barral (FIOCRUZ-BA). 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 5^a passagem de cultivo. As promastigotas foram submetidas a três ciclos de lavagem com salina estéril, 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

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram submetidos 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 culturas de 24 poços, cada poço contendo uma lamínula de vidro redonda de 23 milímetros, na concentração de 1×10^6 células/poço. Os macrófagos foram incubados por 48 h em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C e 95% de umidade. As células não aderidas foram removidas através de 3 lavagens com RPMI morno (37 °C) e cultivadas com meio RPMI suplementado na ausência ou presença de *L. infantum*, em uma proporção de 10 parasitos para 1 célula (10:1) por 12 horas, tempo suficiente para ocorrer a infecção. Os parasitos extracelulares foram removidos por lavagem (3 vezes) com RPMI (37 °C). Após esse período, as células foram tratadas com 16 mg/mL de

antimônio pentavalente (Glucantime®) e CXCL10 (25, 50 e 100 ng/mL) (VASQUEZ; SOONG, 2006), em seguida, foram cultivadas durante 24 e 48 horas a 37 °C, 5% CO₂ e 95% de umidade. Os sobrenadantes das culturas foram coletados com 24 e 48 horas para a dosagem de NO e citocinas (Figura 4).

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 1000 vezes em óleo de imersão. Três áreas de 50 células cada uma foram examinadas e o número de macrófagos infectados/50 células foi determinado.

4.6 Dosagem de citocinas

A concentração das citocinas IL-4, IL-10, TNF- α e IL-12 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). Placas de cultura de 96 poços, fundo chato (Nunc), foram sensibilizadas com o anticorpo de captura anti-citocina purificado na concentração determinada por 12 a 18 horas (dependendo da citocina testada), 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 soro bovino fetal (SBF 10%) em PBS (Solução-tampão fosfato), 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 horas ou por uma noite à temperatura ambiente, este tempo dependendo da citocina testada. Após lavagem com PBS + Tween 20, a placa foi incubada por mais 1 hora 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 (NO_2) 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 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm e a concentração de NO_2 determinada usando uma curva padrão de nitrito de sódio e expressa como $\mu\text{mol/mL}$. Como controle, foi adicionado um branco para cada experimento, utilizando RPMI suplementado, meio utilizado na cultura das células.

4.8 Análise estatística

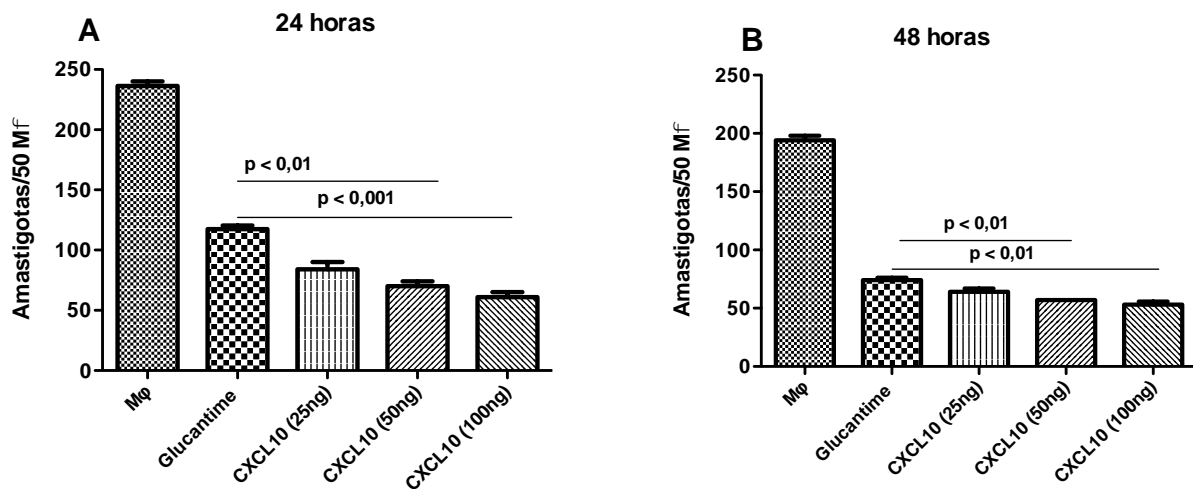
Para verificar a significância estatística entre os grupos tratados e o grupo controle foi aplicado o teste de normalidade e como houve distribuição normal, foi utilizado o teste Mann-Whitney. Para as comparações entre múltiplos grupos foi realizado o teste one-way ANOVA, seguido pelo post-test Tukey. Para todas as análises foi utilizado o Programa GraphPad Prism versão 7,0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Em todos os testes, a significância mínima foi aceita quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da infecção de macrófagos por *Leishmania infantum* in vitro tratados com CXCL10 associado ou não a Glucantime®

Os resultados mostraram que, com 24 horas, o tratamento com CXCL10 resultou em uma significativa diminuição da infecção dos macrófagos nas concentrações de 50 ng/mL (70,3%) e 100 ng/mL (74,0%), quando comparado ao Glucantime® (50,4%) (Gráfico 1A). Com 48 horas, foi observado que CXCL10, nas concentrações de 50ng/mL (70%) e 100ng/mL (72,6%), manteve a redução no número de parasitos intracelulares, quando comparado ao Glucantime® (Gráfico 1B).

Gráfico 1 – Carga parasitária em macrófagos RAW 264.7 infectados com *Leishmania infantum* e tratados com CXCL10

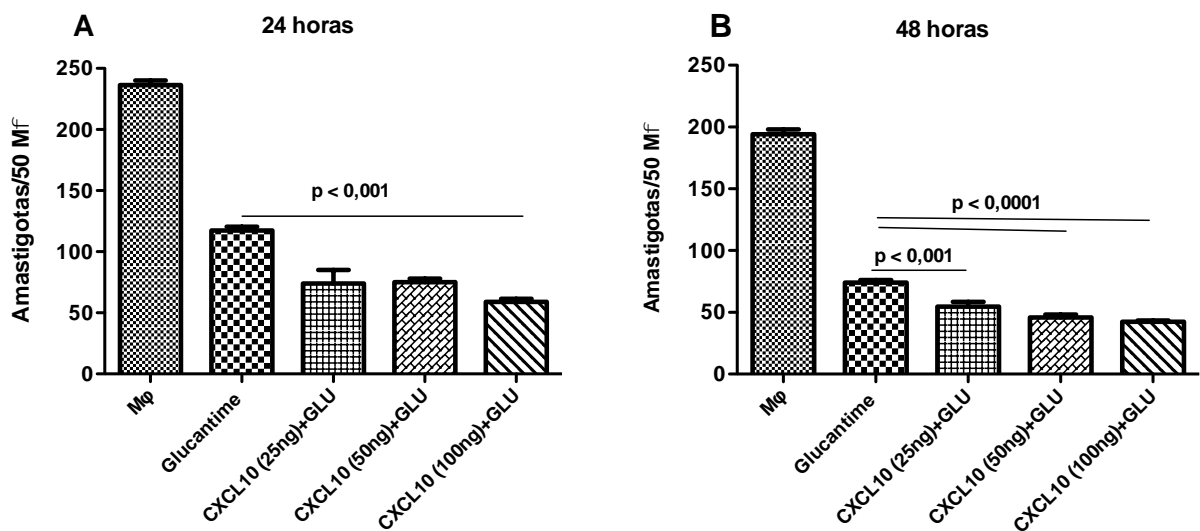


Fonte: Elaborado pelo autor. Macrófagos RAW 264.7 foram infectados com promastigotas de *L. infantum* e após 12 horas de infecção as células foram tratadas in vitro com CXCL10 (25, 50 e 100 ng/mL). Após 24h (A) e 48h (B) de incubação, o número de amastigotas por 50 macrófagos foi determinado em microscópio óptico. Os dados representam a média aritmética \pm erro padrão da média de 2 experimentos independentes. LEGENDA: Mφ = Macrófagos infectados com *L. infantum* sem tratamento. ANOVA, post-test Tukey.

A associação de CXCL10 + Glucantime®, com 24 horas, apresentou também a capacidade de redução da carga parasitária observada para CXCL10 sozinho na concentração de 100 ng/mL (75,0%), e nas concentrações de 25 ng/mL e 50 ng/mL obteve respostas semelhantes na redução da carga parasitária, com diminuição intracelular em ambas de 68%, apesar de não haver significância em relação a Glucantime® (50,4%).

Com 48 horas, a associação de CXCL10 + Glucantime® manteve a redução de parasitos, com todas as concentrações induzindo redução significativa, quando comparado a Glucantime® (Gráfico 2B).

Gráfico 2– Carga parasitária em macrófagos RAW 264.7 infectados com *Leishmania infantum* e tratados com a associação de CXCL10+ Glucantime®



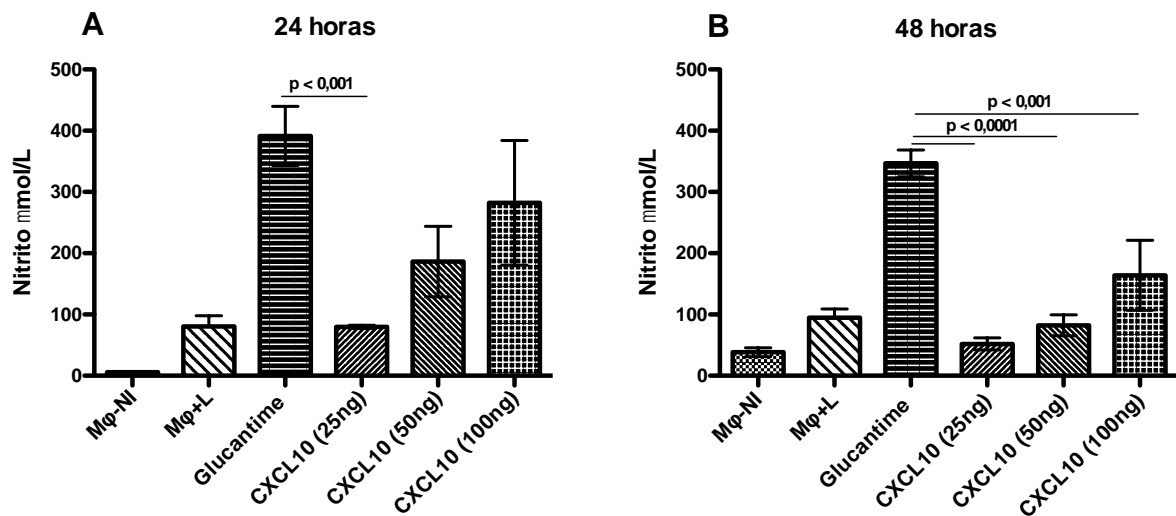
Fonte: Elaborado pelo autor. Macrófagos RAW 264.7 foram infectados com promastigotas de *L. infantum* e após 12 horas de infecção, as células foram tratadas in vitro com a associação de Glucantime® (16 mg/mL) + CXCL10 nas concentrações de 25, 50 e 100 ng/mL. Após 24h (A) e 48h (B) de incubação, o número de amastigotas por 50 macrófagos foi determinado em microscópio óptico. Os dados representam a média aritmética \pm erro padrão da média de 2 independentes experimentos. LEGENDA: Mφ = Macrófagos infectados com *L. infantum* sem tratamento; GLU = Glucantime®. ANOVA, post-test Tukey.

5.2 Produção de óxido nítrico por macrófagos infectados por *Leishmania infantum* in vitro tratados com CXCL10 associado ou não a Glucantime®

Observou-se nas amostras onde CXCL10 foi utilizado que, com 24 horas, a produção de NO apresentou-se com uma produção variando entre 79 $\mu\text{mol/L}$ a 282,3 $\mu\text{mol/L}$, produção menor do que a induzida por Glucantime® (391,5 $\mu\text{mol/L}$). Observou-se ainda que a medida que a concentração da quimiocina aumentou a produção de NO também foi maior (Gráfico 3A).

Com 48 horas, observou-se redução significativa da produção de NO nas amostras tratadas com CXCL10, nas três concentrações (25, 50 e 100 ng/mL). CXCL10 obteve médias de produção variando entre 52,0 $\mu\text{mol/L}$ a 164,0 $\mu\text{mol/L}$, ainda prevalecendo uma maior produção de NO quando as células foram tratadas com Glucantime® (346,7 $\mu\text{mol/L}$) (Gráfico 3B).

Gráfico 3 – Produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 infectados com *Leishmania infantum* e tratados com CXCL10

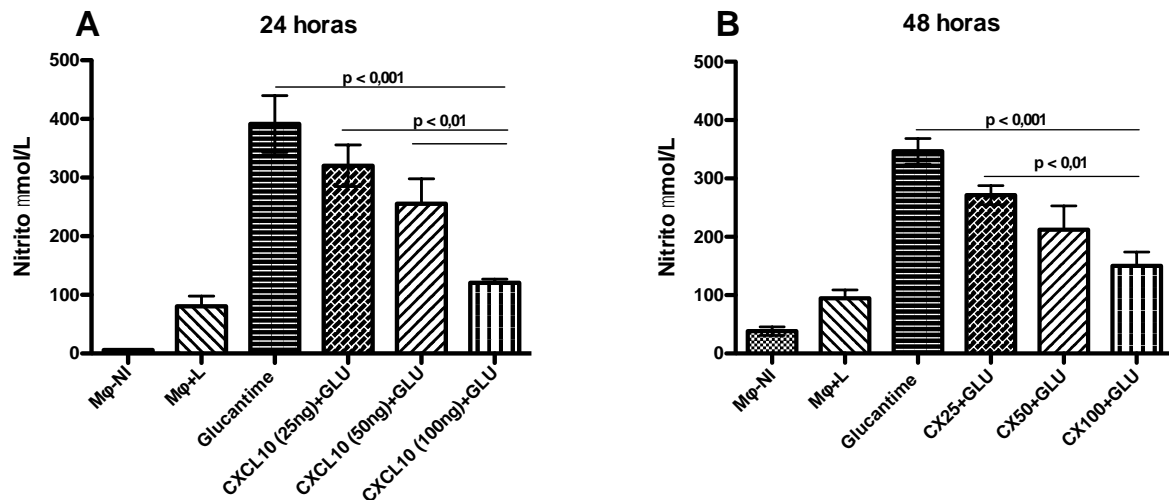


Fonte: Elaborado pelo autor. Macrófagos RAW 264.7 foram infectados com *L. infantum* e após 12 horas de infecção as células foram tratadas in vitro com CXCL10 nas concentrações de 25, 50 e 100 ng/mL e Glucantime® (16 mg/mL). Os sobrenadantes das culturas foram coletados com 24 horas (A) e 48 horas (B) para a dosagem de Nitrito. Os dados representam a média aritmética \pm erro padrão da média de 2 independentes experimentos. LEGENDA: Mφ = Macrófagos; NI = Não Infectados; L = *Leishmania infantum*. ANOVA post-test Tukey.

Analisando a associação de CXCL10+Glucantime®, comparada com Glucantime® sozinho, tanto no período de 24 horas, quanto no de 48 horas (ambos com redução significativa apenas na concentração de 100 ng/mL de CXCL10), observou-se que, ao contrário do que foi observado com o tratamento apenas com CXCL10, ao aumentar a concentração de CXCL10 na associação com Glucantime®, a produção de NO diminuiu (Gráfico 4).

Com 24 horas, o tratamento com CXCL10+Glucantime®, na concentração de 100 ng/mL, induziu uma redução de NO significativa tanto em relação a concentração de 25 ng/mL quanto de 50 ng/mL (Gráfico 4A). Com 48 horas, as amostras se comportaram como no primeiro tempo avaliado, com redução na produção de NO, tendo Glucantime® como o maior indutor de NO (346,7 μ mol/L). Na concentração de 100ng/mL de CXCL10, a redução foi significativa comparada com a menor concentração de CXCL10 (25 ng/mL) (Gráfico 4B).

Gráfico 4 – Produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 infectados com *Leishmania infantum* e tratados com a associação de CXCL10+Glucantime®



Fonte: Elaborado pelo autor. Macrófagos RAW 264.7 foram infectados com *L. infantum* e após 12 horas de infecção as células foram tratadas in vitro com a associação de Glucantime® (16 mg/mL) + CXCL10 nas concentrações de 25, 50 e 100 ng/mL, e Glucantime (16 mg/mL). Os sobrenadantes das culturas foram coletados com 24 horas (A) e 48 horas (B) para a dosagem de Nitrito. Os dados representam a média aritmética \pm erro padrão da média de 2 independentes experimentos. LEGENDA: Mφ = Macrófagos; NI = Não Infectados; L = *Leishmania infantum*; GLU = Glucantime®. ANOVA, post-test Tukey.

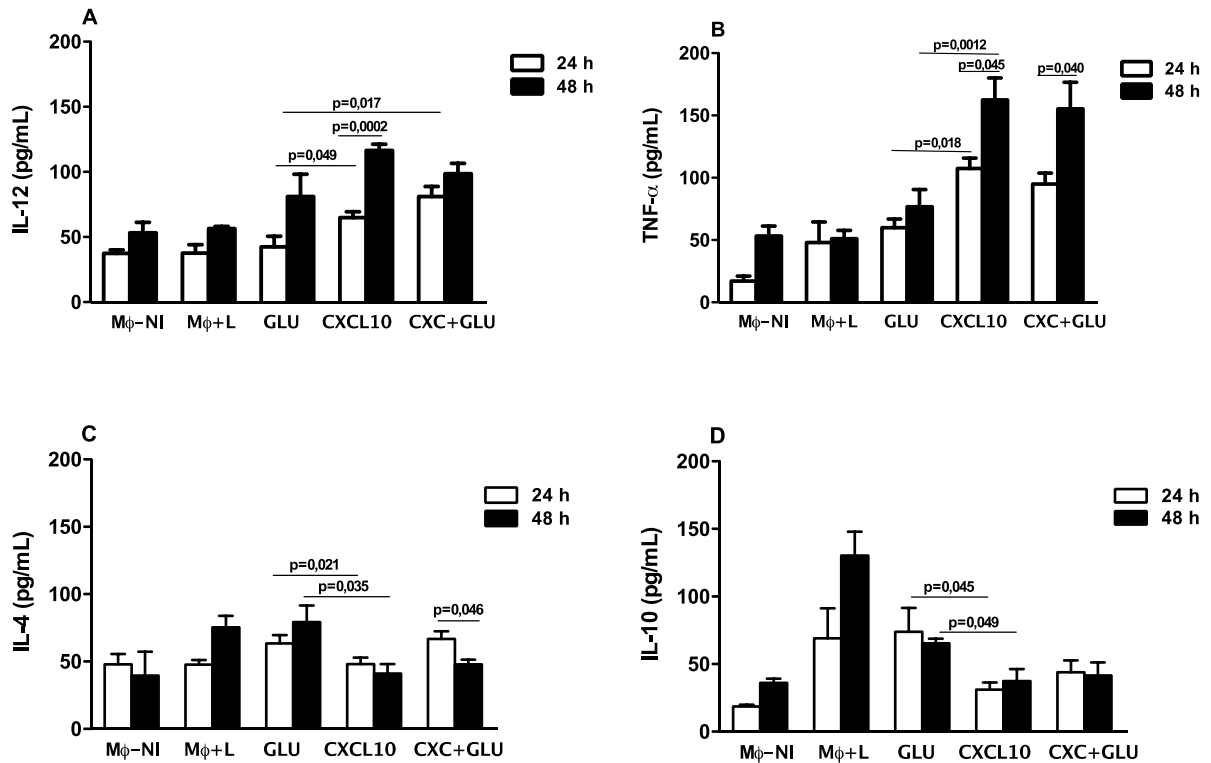
5.3 Produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias em sobrenadante de macrófagos infectados com *L. infantum* e tratados com CXCL10 associado ou não a Glucantime®

A concentração de 50 ng/mL foi escolhida para ser utilizada para os experimentos das dosagens das citocinas com base nos resultados prévios da carga parasitária e produção de NO. Foram avaliadas as concentrações de IL-12, TNF- α , IL-4 e IL-10 nos sobrenadantes colhidos após 24 horas e 48 horas de cultura (Gráfico 5).

Com relação as citocinas inflamatórias, IL-12 e TNF- α , observou-se que CXCL10 sozinho induziu maior concentração de IL-12 após 48 horas ($p=0,0002$), além disso, a concentração de IL-12 foi também significativa quando comparada com Glucantime® (24h, $p=0,049$) (Gráfico 5A). A associação CXCL10+Glucantime® também apresentou indução importante da secreção de IL-12, com significância em relação ao tratamento com Glucantime®, após 24 horas ($p=0,017$) (Gráfico 5A). CXCL10 sozinho induziu uma produção significativa de TNF- α com 48 horas ($p=0,045$), assim também como a associação CXCL10+Glucantime® ($p=0,040$). Vale ressaltar que um aumento significativo na produção de TNF- α foi também observado no tratamento com CXCL10, quando comprado com Glucantime®, tanto com 24 horas ($p=0,018$), como com 48 horas ($p=0,0012$) (Gráfico 5B).

Com relação as citocinas anti-inflamatórias, IL-4 e IL-10, após 24 horas, foi possível observar que CXCL10 promoveu uma redução significativa na secreção de IL-4, tanto com 24 horas ($p=0,021$), como com 48 horas ($p=0,035$) quando comparado ao tratamento com Glucantime® (Gráfico 5C). A associação CXCL10+Glucantime® induziu uma redução significativa na concentração de IL-4 após 48 horas ($p=0,046$) (Gráfico 5C). CXCL10 sozinho também inibiu a secreção de IL-10 com 24 horas ($p=0,045$) e 48 horas ($p=0,049$), quando comprado a Glucantime® (Gráfico 5D). O tratamento com a associação CXCL10+Glucantime® também mostrou uma redução na concentração de IL-10, comparado com Glucantime®, embora não tenha sido estatisticamente significativa (Gráfico 5D).

Gráfico 5 – Produção de IL-12, TNF- α , IL-4 e IL-10 por macrófagos RAW 264.7 infectados com *Leishmania infantum* e tratados com CXCL10 associado ou não a Glucantime®



Fonte: Macrófagos RAW 264.7 foram infectados com *L. infantum* e após 12 horas de infecção as células foram tratadas in vitro com CXCL10 (50 ng/mL), com Glucantime (16 mg/mL), ou com a associação de CXCL10 (50ng/mL) + Glucantime® (16 mg/mL). Os sobrenadantes das culturas foram coletados com 24 horas (\square) e 48 horas (\blacksquare) para a dosagem de IL-12, TNF- α , IL-4 e IL-10. Os dados representam a média aritmética \pm erro padrão da média de 2 independentes experimentos. LEGENDA: M ϕ = Macrófagos; NI = Não Infectados; L = *Leishmania infantum*; GLU = Glucantime®; CXC = CXCL10. ANOVA, post-test Tukey.

6 DISCUSSÃO

As leishmanias suportam 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 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 principalmente por febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia (PALATNIK-DE-SOUSA, 2012).

Neste trabalho, foi avaliado o potencial da associação da quimiocina CXCL10 com Glucantime® em controlar a infecção causada por *L. infantum*, utilizando um modelo *in vitro*. Trabalhos anteriores têm mostrado que o tratamento com quimiocinas é promissor no combate à infecção por *Leishmania*, justificado pela capacidade que algumas quimiocinas têm em induzir a polarização da resposta celular para o perfil Th1, que pode levar ao controle da infecção (DEY *et al.*, 2007; GUPTA *et al.*, 2009).

No presente estudo, foi observado que tanto CXCL10 como a associação CXCL10+Glucantime®, nas três concentrações utilizadas, mostrou importante redução da carga parasitária dos macrófagos infectados, com diminuição maior na concentração de 100ng/mL, 74,0% e 75,0%, respectivamente, sendo essa redução maior do que aquela induzida por Glucantime® (50,4%). Uma análise 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 algumas quimiocinas, entre elas, CXCL10 (MENEZES-SOUZA *et al.*, 2012). Estudo envolvendo cães que são naturalmente ou experimentalmente infectados com *L. infantum* demonstrou que os animais apresentavam CXCL10 altamente expresso no baço, levando a uma resposta imunológica do tipo Th1 (STRAUSS-AYALI; BANETH; JAFFE, 2007). Foi descrito que pacientes com LV apresentam concentrações elevadas de CXCL10 e CXCL9 no seu soro, durante a infecção ativa, sugerindo que estas quimiocinas desempenham um papel importante, juntamente com IFN- γ no controle da infecção (HAILU *et al.*, 2004).

O provável mecanismo efetor da redução parasitária observada no presente trabalho pode estar relacionado à ativação de macrófagos induzida por CXCL10, com

eventual produção de NO, substância que controla a destruição dos parasitos nos macrófagos ativados, uma vez que tem sido relatado que algumas quimiocinas como CCL2 e CXCL10 podem ativar macrófagos, que assim participam efetivamente da redução no número de parasitos intracelulares (Ritter & Moll, 2000).

Neste trabalho, a produção de NO aumentou consideravelmente em macrófagos infectados e tratados com CXCL10, em comparação àqueles infectados e não tratados. Estudos têm mostrado que, em modelos murinos de infecção com *L. major*, IFN- γ apresenta ação sinérgica com TNF- α , e juntas, estas citocinas 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 significante crescimento intracelular mesmo na presença de LPS e IFN- γ , substâncias que usualmente ativam macrófagos (SOUZA *et al.*, 2010).

Por outro lado, a associação de CXCL10+Glucantime® não induziu a produção de NO em macrófagos em níveis comparáveis aqueles observados no grupo tratado apenas com Glucantime®. Apesar disso, foi observada redução da carga parasitária, mesmo com pouca indução de NO, o que pode sugerir que, no presente trabalho, a redução de parasitos *in vitro* não depende exclusivamente de NO, apontando para a participação de outros mediadores na redução dos parasitos intracelulares. Há relatos de que outros produtos do metabolismo do oxigênio estão envolvidos na explosão respiratória em macrófagos murinos ativados, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o ânion superóxido (O₂⁻), colaborando com a eliminação dos parasitos (VAN ASSCHE *et al.*, 2011).

Foi observado também que a medida que a concentração de CXCL10 foi aumentada na associação com Glucantime®, ocorreu redução da produção de NO. Esses dados levantam duas hipóteses, a primeira de que a associação CXCL10+ Glucantime® talvez esteja causando inibição da produção de NO, e a segunda de que, talvez as concentrações usadas nas associações já atingiram seu efeito máximo. Na literatura não foi encontrada referências de que ocorra a inibição do efeito da associação de Glucantime® com outros fármacos ou citocinas, portanto, a segunda hipótese parece a mais plausível. Outros experimentos utilizando concentrações menores de Glucantime® poderiam esclarecer esse achado.

A análise das citocinas mostrou que CXCL10, associada ou não a Glucantime® induziu maior produção de IL-12. Dados da literatura mostram que a carga parasitária pode diminuir em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e tratados com CXCL10, e isso é mediado por IFN- γ , IL-12 e NO (VASQUEZ; SOONG, 2006). IL-12 é uma citocina crítica, necessário para desenvolvimento de células CD4 + Th1 e produção de IFN- γ . Embora macrófagos fagocitem a *Leishmania* de modo eficiente, há evidências de que a sua capacidade de produzir IL-12 é prejudicada seletivamente pelos parasitos. Além disso, os macrófagos ativados produzem também TNF, que atua de uma maneira autócrina para aumentar ainda mais a produção de radicais livres microbicidas por macrófagos (LIU; UZONNA., 2012).

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

O estabelecimento da leishmaniose 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 da infecção por *L. major* em camundongos BALB/c tratados durante o curso da infecção com anticorpos monoclonais anti-IL-4 (SADICK, 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 nível de IFN- γ necessário 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 (MEDEIROS *et al.*, 1998; ANSARI *et al.*, 2006; KURKJIAN *et al.*, 2006).

IL-10 é outra citocina produzida por macrófagos que contribui para a sobrevivência de *Leishmania* nestas células, relacionada como um dos fatores mais importantes para a patogênese da 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, 2007). IL-10 é uma citocina regulatória que pode ser produzida também por células T, B, 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 está relacionada com a alta produção de IL-10 e TGF- β (MURRAY *et al.*, 2002). Estudos envolvendo camundongos deficientes em IL-10 mostraram que estes são altamente resistentes 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).

No presente estudo, CXCL10 sozinho induziu uma produção significativa de TNF- α com 48 horas, assim também como a associação CXCL10+Glucantime®. Além de IFN- γ , TNF- α também está envolvida na ativação de macrófagos e na regulação positiva da expressão de iNOS, levando à produção de NO (CECILIO *et al.*, 2011). TNF- α desempenha, portanto, o papel de citocina sinalizadora do disparo para a geração de NO (BHATTACHARYYA *et al.*, 2002). Estudos mostram que a produção de altos níveis de IFN- γ e TNF- α levam ao controle da infecção (GOMES-SILVA *et al.*, 2007; SCHNORR *et al.*, 2012). Os altos níveis de TNF- α favorecem a ativação das células apresentadoras de antígeno, aumentando então a capacidade das células T CD4⁺ de produzirem IFN- γ (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Recentes abordagens como a terapia de combinação, a administração orientada e o uso de adjuvantes imunológicos são esforços para reduzir as doses eficazes de fármacos disponíveis no mercado e que apresentam altas toxicidades, como os antimoniais pentavalentes, entre eles o Glucantime® (SINGH; SUNDAR, 2014). Estudos com quimiocinas *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). A quimiocina CXCL10, por sua vez, estimula a produção de citocinas de perfil Th1 em infecção por *L. amazonensis* (VASQUEZ; SOONG, 2006) e *L. infantum* (FIGUEIREDO *et al.*, 2017), desempenhando importante papel imunoprotetor em modelos *in vitro* e *in vivo* de *L. donovani* e *L. infantum*, direcionando a resposta imunológica para uma resposta efetora pró-inflamatória (GUPTA *et al.*, 2009; FIGUEIREDO *et al.*, 2017).

Coletivamente, os dados deste trabalho mostra um importante papel protetor da associação da quimiocina CXCL10 com Glucantime®, em macrófagos RAW 264.7 infectados por *L. infantum*, proteção esta, mediada por produção de NO e citocinas pró-inflamatórias (IL-12 e TNF- α) e diminuição de citocinas imunorreguladoras (IL-4 e IL-10). Os dados desse trabalho podem fornecer informações para o desenvolvimento de futuras intervenções terapêuticas para a leishmaniose visceral, utilizando CXCL10 como adjuvante, associado ou não aos antimoniais pentavalentes.

7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o tratamento in vitro com CXCL10 isolado ou com a associação CXCL10+Glucantime® foi capaz de reduzir a carga parasitária dos macrófagos infectados, redução essa maior do aquela observada nos macrófagos tratados apenas com Glucantime®, e induz aumento na produção de NO, IL-12 e TNF- α e supressão de IL-10 e IL-4, apresentando um efeito imunoprotetor em macrófagos RAW 264.7 infectados por *L. infantum*;

Pode-se sugerir que o tratamento in vitro com CXCL10 isolado ou associado ao Glucantime® estimula uma importante resposta efetora pró-inflamatória através da indução da produção de citocinas de perfil Th1, o que pode fornecer informações para o desenvolvimento de futuras intervenções terapêuticas na leishmaniose visceral, utilizando CXCL10 como adjuvante, associado ou não aos antimoniais pentavalentes.

REFERÊNCIAS

- ABREU, Thalles Trindade et al. LESÃO RENAL GLOMERULAR: PROCESSO INFLAMATÓRIO E O PAPEL DAS QUIMIOCINAS. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 21, n. 2, 2017.
- ADRIAENSEN, Wim et al. Immunomodulatory therapy of visceral leishmaniasis in HIV coinfecting patients. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1943, 2017.
- AMATO, Valdir Sabbaga et al. Mucosal leishmaniasis: current scenario and prospects for treatment. **Acta tropica**, v. 105, n. 1, p. 1-9, 2008.
- ANDRADE-FILHO, José Dilermando et al. Occurrence and Probability Maps of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 54, n. 5, p. 1430-1434, 2017.
- ANSARI, Nasim Akhtar; SALUJA, Sumita; SALOTRA, Poonam. Elevated levels of interferon- γ , interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. **Clinical Immunology**, v. 119, n. 3, p. 339-345, 2006.
- ALBUQUERQUE, Polianna Lemos Moura Moreira et al. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Revista panamericana de salud pública**, v. 26, n. 4, p. 330-333, 2009.
- ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- AREVALO, Jorge et al. Influence of *Leishmania* (Viannia) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 195, n. 12, p. 1846-1851, 2007.
- ATTA, Ajax M. et al. Anti-leishmanial IgE antibodies: A marker of active disease in visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 59, n. 3, p. 426-430, 1998.
- BACELLAR, Olívia et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734-6740, 2002.
- BADARO, Roberto et al. Immunotherapy for drug-refractory mucosal leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 194, n. 8, p. 1151-1159, 2006.
- _____. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. **New England Journal of Medicine**, v. 322, n. 1, p. 16-21, 1990.
- _____. *Leishmania donovani*: an opportunistic microbe associated with progressive disease in three immunocompromised patients. **The Lancet**, v. 327, n. 8482, p. 647-649, 1986.

BALANA-FOUCE, R. et al. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.

BATES, Paul A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

BERMAN, Jonathan D.; WYLER, David J. An in vitro model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 142, n. 1, p. 83-86, 1980.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical infectious diseases**, v. 24, n. 4, p. 684-703, 1997.

BHATTACHARYYA, Sandip et al. Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 12, p. 1704-1708, 2002.

BLUM, Arthur M. et al. CD4⁺ T cells from IL-10-deficient mice transfer susceptibility to NSAID-induced Rag colitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 287, n. 2, p. G320-G325, 2004.

BOGDAN, Christian; RÖLLINGHOFF, Martin; DIEFENBACH, Andreas. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological reviews**, v. 173, n. 1, p. 17-26, 2000.

BOOTH, Valerie et al. The CXCR3 binding chemokine IP-10/CXCL10: structure and receptor interactions. **Biochemistry**, v. 41, n. 33, p. 10418-10425, 2002.

BORISH, Larry C.; STEINKE, John W. 2. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2, p. S460-S475, 2003.

BORGES, B. K. A. et al. Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arq bras med vet zootec**, v. 61, n. 5, p. 1035-1043, 2009.

BRASIL. Secretaria da Saúde; Governo do estado do Ceará. Boletim epidemiológico: Leishmaniose visceral. **Secretaria da Saúde**, 9 p., 2017.

_____. Secretaria da Saúde; Governo do estado do Ceará. Boletim epidemiológico: Leishmaniose visceral. **Secretaria da Saúde**, 8 p., 2016.

_____. M. S. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral. **Brasília: Ministério da Saúde**, 19 p., 2006.

CECILIO, C. A. et al. Aging alters the production of iNOS, arginase and cytokines in murine macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 7, p. 671-681, 2011.

CECILIO, P. et al. Deception and Manipulation: The Arms of *Leishmania*, a Successful Parasite. **Frontiers in Immunology**, [s.l.], v. 5, p.1-16, 20 out. 2014.

CENINI, Pietro et al. Mononuclear cell subpopulations and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, n. 4, p. 986-993, 1993.

CHATELAIN, Rene; VARKILA, Kari; COFFMAN, Robert L. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. **The Journal of Immunology**, v. 148, n. 4, p. 1182-1187, 1992.

CHAPPUIS, François et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature reviews microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.

CHARO, Israel F.; RANSOHOFF, Richard M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 6, p. 610-621, 2006.

CHEN, Jun et al. A unique pattern of up- and down- regulation of chemokine receptor CXCR3 on inflammation- inducing Th1 cells. **European journal of immunology**, v. 34, n. 10, p. 2885-2894, 2004.

COLVIN, Richard A. et al. Intracellular domains of CXCR3 that mediate CXCL9, CXCL10, and CXCL11 function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 29, p. 30219-30227, 2004.

COSTA, Carlos Henrique Nery. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2959-2963, 2008.

COSTA, Dorcas Lamounier et al. Predicting death from kala-azar: construction, development, and validation of a score set and accompanying software. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 6, p. 728-740, 2016.

COTTERELL, Sara EJ; ENGWERDA, Christian R.; KAYE, Paul M. *Leishmania donovani* infection initiates T cell- independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T cell- dependent manner. **European journal of immunology**, v. 29, n. 1, p. 203-214, 1999.

CROFT, Simon L.; SUNDAR, Shyam; FAIRLAMB, Alan H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

DE WAAL MALEFYT, René 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**, v. 174, n. 4, p. 915-924, 1991.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 239-243, 2001.

- DEY, R. et al. Induction of Host Protective Th1 Immune Response by Chemokines in Leishmania donovani- infected BALB/c Mice. **Scandinavian journal of immunology**, v. 66, n. 6, p. 671-683, 2007.
- DIAZ, Nilka Luisa; ZERPA, Olga; TAPIA, Félix Jacobo. Chemokines and chemokine receptors expression in the lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 4, p. 446-452, 2013.
- DOREA, J. G. et al. Antimony accumulation in hair during treatment of leishmaniasis. **Clinical chemistry**, v. 33, n. 11, p. 2081-2082, 1987.
- DUFOUR, Jennifer H. et al. IFN- γ -inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 7, p. 3195-3204, 2002.
- ENGWERDA, Christian R.; KAYE, Paul M. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. **Immunology today**, v. 21, n. 2, p. 73-78, 2000.
- ENGWERDA, Christian R.; ATO, Manabu; KAYE, Paul M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends in parasitology**, v. 20, n. 11, p. 524-530, 2004.
- FALLAHI, P.; ELIA, G.; BONATTI, A. Leishmaniasis and IFN- γ dependent chemokines. **La Clinica terapeutica**, v. 167, n. 5, p. e117-e122, 2016.
- FARBER, Joshua M. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. **Journal of leukocyte biology**, v. 61, n. 3, p. 246-257, 1997.
- FERREIRA, Josie Haydée L. et al. Immunization with the cysteine proteinase Ldcccys1 gene from Leishmania (Leishmania) chagasi and the recombinant Ldcccys1 protein elicits protective immune responses in a murine model of visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 26, n. 5, p. 677-685, 2008.
- FIGUEIREDO, Weberty Mayk Eufrásio et al. Protection mediated by chemokine CXCL10 in BALB/c mice infected by Leishmania infantum. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 561-568, 2017.
- FILARDY, Alessandra A.; PIRES, Dayana R.; DOSREIS, George A. Macrophages and neutrophils cooperate in immune responses to Leishmania infection. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 11, p. 1863-1870, 2011.
- GHALIB, Hashim W. et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human Leishmania donovani infections. **The Journal of clinical investigation**, v. 92, n. 1, p. 324-329, 1993.
- GOMES-SILVA, A. et al. Can interferon- γ and interleukin- 10 balance be associated with severity of human Leishmania (Viannia) braziliensis infection?. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 149, n. 3, p. 440-444, 2007.

GREEN, Shawn J. et al. Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **The Journal of Immunology**, v. 145, n. 12, p. 4290-4297, 1990.

GUPTA, G. et al. Treatment with IP-10 induces host-protective immune response by regulating the T regulatory cell functioning in *Leishmania donovani*-infected mice. **Medical Microbiology and Immunology**, [s.l.], v. 200, n. 4, p.241-253, 2011.

GUPTA, Gaurav et al. CXC Chemokine–Mediated Protection against Visceral Leishmaniasis: Involvement of the Proinflammatory Response. **The Journal of infectious diseases**, v. 200, n. 8, p. 1300-1310, 2009.

HAILU, Asrat et al. Elevated plasma levels of interferon (IFN)- γ , IFN- γ inducing cytokines, and IFN- γ inducible CXC chemokines in visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 71, n. 5, p. 561-567, 2004.

HOLZMULLER, Philippe; BRAS-GONÇALVES, Rachel; LEMESRE, J.-I. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in Leishmania. **Parasitology**, v. 132, n. S1, p. S19-S32, 2006.

HOLZMULLER, Philippe et al. Nitric oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in *Leishmania amazonensis* amastigotes. **Infection and immunity**, v. 70, n. 7, p. 3727-3735, 2002.

HOTEZ, Peter J. Nuclear weapons and neglected diseases: the “ten-thousand-to-one gap”. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 4, p. e680, 2010.

_____. Control of neglected tropical diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018-1027, 2007.

JONES, Emma et al. The influence of macrophage inflammatory protein- 1 α on protective immunity mediated by antiviral cytotoxic T cells. **Immunology**, v. 109, n. 1, p. 68-75, 2003.

KAYE, Paul M. et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological reviews**, v. 201, n. 1, p. 239-253, 2004.

_____. Deficient expression of co- stimulatory molecules on *Leishmania*- infected macrophages. **European journal of immunology**, v. 24, n. 11, p. 2850-2854, 1994.

KALANTARI, Heibatullah et al. Effect of topical nanoliposomes of paromomycin on rats liver and kidney. **Jundishapur journal of natural pharmaceutical products**, v. 9, n. 4, 2014.

KARP, Christopher L. et al. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 4, p. 1644, 1993.

KOPF, Manfred et al. IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 3, p. 1127-1136, 1996.

KURKJIAN, Katie M. et al. Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. **Cytometry Part A**, v. 69, n. 5, p. 353-358, 2006.

LANG, Thierry; LECOEUR, Hervé; PRINA, Eric. Imaging Leishmania development in their host cells. **Trends in parasitology**, v. 25, n. 10, p. 464-473, 2009.

LEE, Eun Young; LEE, Zang-Hee; SONG, Yeong Wook. CXCL10 and autoimmune diseases. **Autoimmunity reviews**, v. 8, n. 5, p. 379-383, 2009.

LIEW, Foo Y.; WEI, Xiao-Qing; PROUDFOOT, Lorna. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 352, n. 1359, p. 1311-1315, 1997.

LIU, Dong; UZONNA, Jude 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**, v. 2, 2012.

MALTEZOU, H. C. Drug Resistance in Visceral Leishmaniasis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [s.l.], v. 2010, p.1-8, 2010.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of Leishmania chagasi. **Parasitology today**, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

MEDEIROS, Iara Marques de; CASTELO, Adauto; SALOMAO, Reinaldo. Presence of circulating levels of interferon-g, interleukin-10 and tumor necrosis factor-a in patients with visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n. 1, p. 31-34, 1998.

MEGE, Jean-Louis et al. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. **The Lancet infectious diseases**, v. 6, n. 9, p. 557-569, 2006.

MENEZES-SOUZA, Daniel et al. Higher expression of CCL2, CCL4, CCL5, CCL21, and CXCL8 chemokines in the skin associated with parasite density in canine visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 4, p. e1566, 2012.

MOHAN, Karkada et al. CXCR3 is required for migration to dermal inflammation by normal and in vivo activated T cells: differential requirements by CD4 and CD8 memory subsets. **European journal of immunology**, v. 35, n. 6, p. 1702-1711, 2005.

MONTAKHAB- YEGANEH, Hossein et al. Leishmania tarentolae expressing CXCL- 10 as an efficient immunotherapy approach against Leishmania major- infected BALB/c mice. **Parasite immunology**, v. 39, n. 10, 2017.

MOORE, Kevin W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual review of immunology**, v. 19, n. 1, p. 683-765, 2001.

MORENO, Juan Antonio et al. Role of chemokines in proteinuric kidney disorders. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 16, 2014.

- MOSER, B; WILLIMANN, K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. **Annals of The Rheumatic Diseases**, [s.l.], v. 63, n. 2, p.84-89, 2004.
- MULLER, K.; et al. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v.190, p.73–76, 2001.
- MURDOCH, Craig; FINN, Adam. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**, v. 95, n. 10, p. 3032-3043, 2000.
- MURRAY, Henry W.; HARIPRASHAD, June. Interleukin 12 is effective treatment for an established systemic intracellular infection: experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. 1, p. 387-391, 1995.
- MURRAY, Henry W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.
- _____. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. **Infection and immunity**, v. 70, n. 11, p. 6284-6293, 2002.
- _____. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental visceral leishmaniasis. **The Journal of clinical investigation**, v. 95, n. 3, p. 1183-1192, 1995.
- NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia Humana**. Rio de Janeiro: Editora Atheneu Rio, 2016. 264 p.
- NYLÉN, Susanne; GAUTAM, Shalini. Immunological perspectives of leishmaniasis. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 135, 2010.
- NYLÉN, Susanne; SACKS, David. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in immunology**, v. 28, n. 9, p. 378-384, 2007.
- OGHUMU, Steve et al. Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. **Experimental parasitology**, v. 126, n. 3, p. 389-396, 2010.
- OLIVEIRA, Walker Nonato et al. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, v. 66, n. 2, p. 127-132, 2014.
- ORDEIX, LAURA et al. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite- specific cellular immune responses. **Veterinary dermatology**, v. 16, n. 3, p. 187-191, 2005.
- OUELLETTE, Marc; DRUMMELSMITH, Jolyne; PAPADOPOULOU, Barbara. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 4, p. 257-266, 2004.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas**. Pan American Health Org, n 5, 2017.

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

PALOMINO, Diana Carolina Torres; MARTI, Luciana Cavalheiro. Chemokines and immunity. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 13, n. 3, p. 469-473, 2015.

PASTORINO, Antonio C. et al. Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects. **Jornal de pediatria**, v. 78, n. 2, p. 120-127, 2002.

PEARSON, Richard D.; DE QUEIROZ SOUSA, Anastacio. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, p. 1-11, 1996.

PISCOPO, T V; MALLIA, A C. Leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal**, [s.l.], v. 82, n. 972, p.649-657, 1 out. 2006.

RATH, Susanne. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado de arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p.550-555, 2003.

RAVEL, Christophe et al. A polymorphic minisatellite sequence in the subtelomeric regions of chromosomes I and V in *Leishmania infantum*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 74, n. 1, p. 31-41, 1995.

RITTER, U.; MOLL, H. Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of *leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4. **European journal of immunology**, v. 30, n. 11, p. 3111-3120, 2000.

RITTER, Uwe; KÖRNER, Heinrich. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 24, n. 6, p. 295-301, 2002.

ROBERTS, William L.; MCMURRAY, Walter J.; RAINEY, Petrie M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1076-1082, 1998.

RODRIGUES, Vasco et al. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 118, 2016.

RODRIGUEZ-SOSA, Miriam et al. CC chemokine receptor 1 enhances susceptibility to *Leishmania major* during early phase of infection. **Immunology and cell biology**, v. 81, n. 2, p. 114-120, 2003.

ROSSI, Devora; ZLOTNIK, Albert. The biology of chemokines and their receptors. **Annual review of immunology**, v. 18, n. 1, p. 217-242, 2000.

ROT, Antal; VON ANDRIAN, Ulrich H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 891-928, 2004.

- SACKS, David; NOBEN-TRAUTH, Nancy. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002.
- SADICK, Michael D. et al. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 171, n. 1, p. 115-127, 1990.
- SCHNORR, Daniel et al. 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. e1947, 2012.
- SHAKYA, Nishi et al. Augmentation of antileishmanial efficacy of miltefosine in combination with tuftsin against experimental visceral leishmaniasis. **Parasitology research**, v. 111, n. 2, p. 563-570, 2012.
- SINGH, Om Prakash; SUNDAR, Shyam. Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prospects. **Frontiers in immunology**, v. 5, 2014.
- SOONG, Lynn. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 7, p. 4355-4360, 2008.
- SOUZA, Anselmo S. et al. Resistance of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF- α production. **BMC infectious diseases**, v. 10, n. 1, p. 209, 2010.
- STAGER, Simona; JOSHI, Trupti; BANKOTI, Rashmi. Immune evasive mechanisms contributing to persistent *Leishmania donovani* infection. **Immunologic research**, v. 47, n. 1-3, p. 14-24, 2010.
- STANLEY, Amanda C.; ENGWERDA, Christian R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 138-147, 2007.
- STRAUSS-AYALI, Dalit; BANETH, Gad; JAFFE, Charles L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Veterinary research**, v. 38, n. 4, p. 547-564, 2007.
- SUNDAR, Shyam et al. Response to interferon- γ plus pentavalent antimony in Indian visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 4, p. 1117-1119, 1997.
- TEIXEIRA, Maria Jania et al. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 1, p. 32-40, 2006.
- TORRES, Davi Coe et al. Assessment of drug resistance related genes as candidate markers for treatment outcome prediction of cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Acta tropica**, v. 126, n. 2, p. 132-141, 2013.
- VAN ASSCHE, Tim et al. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337-351, 2011.
- VARELLA, Pedro PV; FORTE, Wilma C. Neves. Citocinas: revisão. **Rev bras alergologia imunopatol**, v. 24, p. 146-154, 2001.

VASQUEZ, Rene E.; SOONG, Lynn. CXCL10/gamma interferon-inducible protein 10-mediated protection against *Leishmania amazonensis* infection in mice. **Infection and immunity**, v. 74, n. 12, p. 6769-6777, 2006.

VESTER, Bettina et al. Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. **Infection and immunity**, v. 67, n. 6, p. 3155-3159, 1999.

VIOLA, Antonella; LUSTER, Andrew D. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 48, p. 171-197, 2008.

VON STEBUT, Esther. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. **European journal of dermatology**, v. 17, n. 2, p. 115-122, 2007.

VOULDOUKIS, Ioannis et al. Interleukin- 10 and interleukin- 4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. **European journal of immunology**, v. 27, n. 4, p. 860-865, 1997.

WILSON, Mary E.; JERONIMO, Selma MB; PEARSON, Richard D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial pathogenesis**, v. 38, n. 4, p. 147-160, 2005.

WU, Jiayi et al. IL-10 inhibits the synthesis of migration inhibitory factor and migration inhibitory factor-mediated macrophage activation. **The Journal of Immunology**, v. 151, n. 8, p. 4325-4332, 1993.

ZWINGENBERGER, Kai et al. Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis: evidence for predominance of endogenous interleukin 4 over interferon- γ production. **Clinical immunology and immunopathology**, v. 57, n. 2, p. 242-249, 1990.